

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft  
**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7344

**Das fokale Adhäsionsprotein  
Trip6 und seine nukleäre  
Isoform nTrip6 in der Maus –  
Charakterisierung und  
Manipulation der *trip6*  
Genexpression zur  
selektiven Analyse von  
Trip6- und nTrip6-vermittelten  
Funktionen *in vivo***

**M. Winter**

Institut für Toxikologie und Genetik

November 2007



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7344

**Das fokale Adhäsionsprotein Trip6 und seine  
nukleäre Isoform nTrip6 in der Maus –  
Charakterisierung und Manipulation der *trip6*  
Genexpression zur selektiven Analyse von  
Trip6- und nTrip6-vermittelten Funktionen *in vivo***

Markus Winter

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität  
Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-073446

**Das fokale Adhäsionsprotein Trip6 und seine  
nukleäre Isoform nTrip6 in der Maus –  
Charakterisierung und Manipulation der *trip6*-Genexpression  
zur selektiven Analyse  
von Trip6- und nTrip6-vermittelten Funktionen *in vivo***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

Markus Winter

aus Speyer

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta

Referent: Prof. Dr. Andrew Cato

Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2007



## Zusammenfassung

Die Transduktion eines extrazellulären Signals von der Plasmamembran zu selektiven Kompartimenten im Inneren der Zelle erfordert die Bildung von Multiproteinkomplexen spezifischer Zusammensetzung und Lokalisation. Adapterproteine, wie die LIM-Domänen-Proteine, spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Proteinen zu ihren Interaktionspartnern im Proteinnetzwerk. Das intrazelluläre Adhäsionsprotein Trip6 und die kleinere, kernspezifische Isoform nTrip6 sind beides LIM-Domänen-Proteine, die durch das *trip6* Gen kodiert werden, jedoch in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Trip6 reguliert die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen an der Plasmamembran, wohingegen nTrip6 im Nukleus als Koaktivator für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B fungiert. Die spezifische intrazelluläre Verteilung von Trip6 und nTrip6 deutet daraufhin, dass die *trip6* Protein-Isoformen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften der Zelle regulieren. Trip6 könnte die Zellmigration und Adhäsion und nTrip6 die Zellproliferation und Differenzierung modulieren. Jegliche Störung des Gleichgewichts der Funktionen von Trip6 und nTrip6 könnte somit signifikante Auswirkungen auf pathologische Prozesse, wie Entzündungsreaktionen, Tumorgenese oder Metastasierung, zur Folge haben.

Bisher ist weder der Mechanismus der zur Bildung der *trip6* Isoformen führt, noch die *in vivo* Relevanz der Trip6 und nTrip6 Funktionen bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war daher eine konditionell *trip6* defiziente Mauslinie zu generieren, um die Funktionen von *trip6 in vivo* zu untersuchen. Anhand der konditionellen Gen-*targeting* Methode habe ich das *trip6* Gen in murinen embryonalen Stammzellen modifiziert. In diesen Zellen wurde das *trip6* Gen durch Cre-DNA-Rekombinase Erkennungssequenzen (LoxP-Sequenzen) flankiert. Die Cre-Expression führt zur Exzision von LoxP-Sequenzen flankierten DNA-Abschnitten. Es ist jetzt möglich diese embryonalen Stammzellen zu nutzen, um eine konditionell *trip6* defiziente Mauslinie zu generieren, in der beide Trip6 Isoformen deletiert sein werden. Eine Strategie die Funktionen der zwei Trip6 Isoformen *in vivo* unterscheiden zu können, wäre die Rekonstitution einer *trip6* defizienten Maus mit nur einer der beiden Isoformen. Die Voraussetzung dafür war daher die Identifizierung des Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt.

In dieser Arbeit ist es mir gelungen zu zeigen, dass nTrip6 nicht durch Translation einer alternativ gespleißten *trip6* mRNA, sondern durch alternative Translationsinitiation an einem sekundären Startkodon gebildet wird. Sowohl in Mutagenese-Experimenten als auch durch Verwendung spezifischer Morpholinos zur sterischen Blockierung der Translationsinitiation, konnte ich zeigen, dass das AUG-Kodon an Position 480 der *trip6* mRNA für die Translation von murinem nTrip6 genutzt wird. Die alternative Translationsinitiation an diesem Startkodon war mRNA-kappenabhängig und benötigt keine internen ribosomalen Eingangsstellen (IRES). Des Weiteren konnte ein Morpholino der gegen das sekundäre Startkodon gerichtet war und nur die Translation von nTrip6 blockierte, die TPA-induzierte Aktivierung eines AP-1-Zielpromotors inhibieren. Die selektive Manipulation der konventionellen oder alternativen Translationsinitiation an der *trip6* mRNA stellt jetzt eine Strategie dar, die Bildung und Funktion von Trip6 oder nTrip6 in spezifischer Weise zu blockieren, um so deren jeweilige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Migration zu untersuchen. Darüber hinaus wird das Wissen über die Bildung der beiden Trip6 Isoformen nützlich sein, ihre jeweiligen Funktionen *in vivo* zu untersuchen, indem eine *trip6*-defiziente Mauslinie entweder mit Trip6 oder nTrip6 spezifisch rekonstituiert wird.

## Abstract

### **The focal adhesion protein Trip6 and its nuclear isoform nTrip6 in the mouse – characterisation and manipulation of the *trip6* gene expression intended for a selective analysis of Trip6- and nTrip6-dependent functions *in vivo***

Transduction of an extracellular signal from the plasma membrane to specific compartments in the cell requires the formation of multi protein complexes of distinct composition and localization. Adaptor proteins, such as LIM domain proteins, play an important role in the recruitment of proteins to their interaction partners within the protein network. The intracellular adhesion protein Trip6 and its smaller, nuclear isoform nTrip6 are both LIM domain proteins encoded by the gene *trip6* but are localized in different cellular compartments. Trip6 regulates the formation of focal adhesion plaques at the plasma membrane while nTrip6 acts in the nucleus, as co-activator for the transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. Due to their specific intracellular distribution the two *trip6* protein isoforms regulate different functional properties of the cell. Trip6 might modulate cell migration and adhesion and nTrip6 might regulate cell proliferation and differentiation. Any imbalance in Trip6 and nTrip6 functions might have significant consequences in pathological situations such as inflammation, cancer or metastasis.

Neither the mechanism by which the two isoforms are generated, nor the *in vivo* relevance of Trip6 and nTrip6 functions is known. Thus, one aim of this work was to generate a conditional *trip6* deficient mouse strain to study the functions of *trip6* *in vivo*. I modified the *trip6* gene by conditional gene targeting in murine embryonic stem cells. In these cells the *trip6* gene was flanked by Cre-DNA-recombinase recognition sites (loxP-sites). Cre-expression leads to excision of loxP-sites flanked DNA-sequences. It is now possible to use these embryonic stem cells to generate a conditional *trip6* deficient mouse line. In this mouse, both Trip6 isoforms will be knocked out. To discriminate the functions of the two isoforms *in vivo*, one strategy would be to reconstitute the knockout mouse with only one isoform. A prerequisite was thus to identify the mechanism of nTrip6 generation.

In this work, I showed that nTrip6 is not generated by translation of an alternatively spliced *trip6* mRNA but through alternative translation initiation at a secondary start site. In mutagenesis studies as well as by the use of specific morpholinos to sterically block translation initiation, I showed that the AUG codon at position 480 in the murine *trip6* mRNA is utilized for the translation of nTrip6. The alternative translation initiation at this site was mRNA cap-dependent and did not require internal ribosome entry sites (IRES). Furthermore a morpholino targeting the secondary AUG and knocking down only nTrip6 repressed the TPA-induced activation of an AP-1 target promoter. Thus the selective manipulation of conventional or alternative translation initiation at the *trip6* mRNA will now serve as a strategy to specifically block the generation and function of Trip6 or nTrip6, in order to study their respective roles in cell proliferation, differentiation and migration. Moreover, the knowledge about the generation of the two isoforms will be valuable to study their respective functions *in vivo*, by the specific rescue of the knockout mouse with either Trip6 or nTrip6.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>1. Einleitung</b> .....	7
1.1 Das LIM-Domänen Protein Trip6 .....	8
1.2 Die nukleäre Trip6 Isoform – nTrip6 .....	11
1.3 Molekulare Mechanismen die zur Bildung von nTrip6 führen könnten .....	14
1.4 Die konditionelle Inaktivierung von Genen .....	18
1.4.1 Die Cre-vermittelte Rekombination .....	19
1.4.2 Generierung konditioneller Genmodifikationen .....	20
1.4.2.1 Die drei Rekombinationsereignisse nach transienter Cre-Expression .....	21
1.5 Zielsetzung .....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	23
2.1 Material .....	23
2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen.....	23
2.1.2 Radiochemikalien.....	24
2.1.3 Zellkulturchemikalien für die embryonale Stammzellenkultur .....	24
2.1.4 Kits .....	24
2.1.5 Enzyme und sonstige Reagenzien .....	24
2.1.6 Bakterienstämme .....	25
2.1.7 Zelllinien .....	25
2.1.8 Mäusestämme.....	26
2.1.9 Oligonukleotidprimer .....	26
2.1.10 Northern Blot Proben .....	27
2.1.11 siRNA.....	27
2.1.12 Morpholinos .....	27
2.1.13 Plasmidkonstrukte .....	27
2.1.14 Antikörper .....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Nukleinsäure-Methoden .....	31
2.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren .....	31
2.2.1.2 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen .....	31

2.2.1.3	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen .....	32
2.2.1.4	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	32
2.2.1.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese ....	32
2.2.1.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	33
2.2.1.7	Ligation von Nukleinsäurefragmenten.....	33
2.2.1.8	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	33
2.2.1.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	34
2.2.1.10	Zero Blunt TOPO PCR Klonierung ( <i>Pool</i> -Klonierungsverfahren).....	34
2.2.1.11	Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA .....	35
2.2.1.12	Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA.....	36
2.2.1.13	Präparation von großen Mengen rekombinanter Plasmid-DNA .....	36
2.2.1.14	Radioaktive Markierung von DNA .....	37
2.2.1.15	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen .....	38
2.2.1.16	<i>Southern</i> Blot.....	38
2.2.1.17	<i>Southern</i> Blot Hybridisierung.....	39
2.2.1.18	Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen .....	39
2.2.1.19	cDNA-Synthese und RT-PCR.....	40
2.2.1.20	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	40
2.2.1.21	<i>Northern</i> Blot .....	40
2.2.1.22	<i>Northern</i> Blot Hybridisierung .....	41
2.2.1.23	Detektion von radioaktiven Signalen .....	41
2.2.2	Klonierung des pTVFlox- <i>trip6 targeting</i> Vektors .....	41
2.2.3	Protein-Methoden.....	45
2.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	45
2.2.3.2	Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	45
2.2.3.3	Western-Blot und immunchemische Detektion von Proteinen .....	46
2.2.3.4	Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten.....	46
2.2.3.5	<i>In vitro</i> Translation.....	47
2.2.3.6	Luziferase-Reportergen-Analyse .....	47
2.2.3.7	Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen .....	48
2.2.4	Zellkulturmethoden .....	49
2.2.4.1	Transformierte Säugetierzelllinien.....	49
2.2.4.1.1	Kulturbedingungen.....	49
2.2.4.1.2	Passagieren von Zellen.....	49

2.2.4.1.3	Bestimmung der Zellzahl .....	49
2.2.4.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	50
2.2.4.1.5	Plasmid-DNA Transfektion mittels Lipofectamin 2000 .....	50
2.2.4.1.6	siRNA Transfektion mittels Lipofectamin 2000 in NIH-3T3 .....	50
2.2.4.1.7	Morpholino Transfektion mittels Endoporters in NIH-3T3 .....	51
2.2.4.1.8	TPA-Behandlung von NIH-3T3 nach Morpholino Transfektion .....	51
2.2.4.2	Embryonale-Stammzelllinien.....	51
2.2.4.2.1	Kulturbedingungen.....	51
2.2.4.2.2	Elektroporation embryonaler Stammzellen.....	52
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1	Generierung einer konditionell <i>trip6</i> -defizienten Maus zur Untersuchung der Funktionen von Trip6 und nTrip6 <i>in vivo</i> .....	53
3.1.1	Strategie und Klonierung des <i>trip6-targeting</i> -Vektors .....	55
3.1.2	Stabile Transfektion des <i>trip6-targeting</i> -Vektors in embryonale Stammzellen und Identifizierung homolog rekombinierter Stammzellen.....	58
3.1.3	Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des <i>neo</i> -Gens in den homolog rekombinierten ES-Zellklonen.....	62
3.1.4	Blastozysteninjektion und Transfer in pseudoschwangere Mäuse.....	62
3.1.5	Stabile Transfektion des <i>trip6-targeting</i> -Vektors in E14.1 ES-Zellen und Identifizierung homologer Rekombinanten.....	63
3.2	Identifizierung des molekularen Mechanismus der nTrip6 Expression.....	65
3.2.1	Endogenes nTrip6 hat ein Molekulargewicht von 40 kDa und ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert.....	65
3.2.2	Endogenes nTrip6 wird nicht durch alternatives Spleißen gebildet.....	68
3.2.3	Die 40 kDa große Trip6-Isoform wird durch einen sekundären Translationsstart gebildet .....	78
3.2.4	Die Translationsinitiation am sekundären Startkodon ist verantwortlich für die nukleäre Lokalisation der 40 kDa Trip6-Isoform.....	82
3.2.5	Endogenes nTrip6 wird durch sekundären Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA gebildet.....	85
3.2.6	Endogenes nTrip6 wird durch kappenabhängige Translationsinitiation gebildet ...	88
3.2.7	Sterische Blockierung der sekundären Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA inhibiert die transkriptionelle Aktivität von AP-1 .....	90

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1	Generierung eines Mausmodels zur Untersuchung der Trip6 und nTrip6 vermittelten Funktionen <i>in vivo</i> .....	93
4.2	Alternative Translationsinitiation und nicht alternatives Spleißen führt zur Bildung von nTrip6 .....	97
4.2.1	Regulation der alternativen Translationsinitiation an der Trip6-mRNA.....	99
4.2.2	Bedeutung einer translationellen Kontrolle der Trip6 mRNA .....	101
4.3	Ausblick: Trip6 und nTrip6 vermittelte Funktionen können differenziert untersucht werden .....	103
<b>5.</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>116</b>

## 1. Einleitung

Alle Funktionen von Zellen unterstehen der ständigen Regulation durch Signale, die aus der extrazellulären Umgebung auf die Zelle einwirken. Diese Signale werden von Rezeptoren erkannt und durch unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden an das zytosolische oder nukleäre Zellkompartiment weitergeleitet, wo sie kompartimentspezifische Prozesse regulieren. Die Fähigkeit des intrazellulären Signalnetzwerks, verschiedene regulatorische Informationen einzuordnen und weiterzuleiten, erfordert die Bildung individueller Multiproteinkomplexe. Diese Komplexe können, entsprechend ihrer Zusammensetzung aus Proteinen unterschiedlicher Funktion, bestimmte Signale empfangen und diese in spezifischer Weise verarbeiten.

Die Bildung von Multiproteinkomplexen wird durch Proteine vermittelt, die bestimmte Protein-Interaktionsdomänen besitzen. Erst in den letzten Jahren wurde erkannt, dass Protein-Interaktionsdomänen Schlüsselkomponenten des regulatorischen Signalnetzwerks der Zelle sind (Pawson und Nash, 2003). Zu den Protein-Interaktionsdomänen gehören die LIM-Domänen (Bach, 2000), die in den Protein-Isoformen Trip6 und nTrip6 enthalten sind (Lee et al., 1995; Kassel et al., 2004).

Trip6 ist im Zytosol lokalisiert, wo es als Adapterprotein an der Bildung von membran-assoziierten Multiproteinkomplexen, den fokalen Adhäsionskomplexen, beteiligt ist. Fokale Adhäsionskomplexe sind Kontaktstellen, die sich bei der Verbindung des Aktin-Zytoskeletts einer Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM) ausbilden. Sie dienen sowohl der Adhäsion der Zelle an die umgebende EZM, sowie der Signaltransduktion. nTrip6 befindet sich im Zellkern und fungiert als Adapterprotein für Transkriptionsfaktoren. In dieser Funktion stellt nTrip6 den Kontakt zwischen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren und ihren aktivitätsmodulierenden Faktoren im Nukleus her.

Bisher sind nur wenige Funktionen von Trip6 und nTrip6 anhand von Zellkulturexperimenten bekannt. Ihre individuelle subzelluläre Verteilung spricht jedoch dafür, dass sie in ihrer Funktion als Adapterproteine unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen.

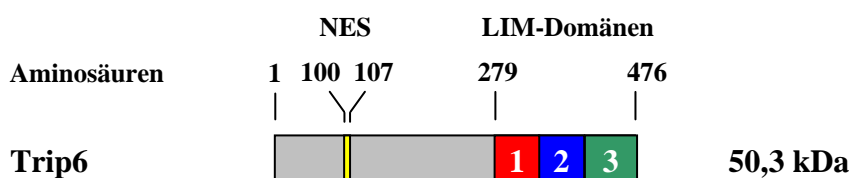
Um erstmals die Funktionen von Trip6 und nTrip6 *in vivo* untersuchen zu können, soll in dieser Arbeit eine konditionell *trip6* defiziente Mauslinie generiert werden. Im Folgenden soll nun näher auf die bisher bekannten Funktionen von Trip6 und nTrip6 eingegangen werden, die zukünftig *in vivo* untersucht werden könnten.

## 1.1 Das LIM-Domänen Protein Trip6

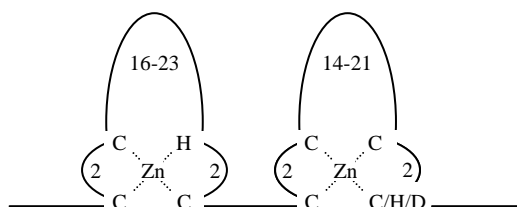
Trip6 wurde 1995 erstmals als Thyroidhormonrezeptor-interagierendes Protein in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System beschrieben, woraus der Name *thyroid hormone receptor interacting protein* (Trip6) abgeleitet wurde (Lee et al., 1995). Das humane *trip6* Gen ist im Chromosom 7q22 lokalisiert und kodiert das ubiquitär exprimierte 50,3 kDa Trip6 Protein, bestehend aus 476 Aminosäuren (Abb. 1A; Yi und Beckerle, 1998).

Der carboxyterminale Sequenzabschnitt von Trip6 enthält drei hintereinander liegende LIM-Domänen (Lee et al., 1995; Yi und Beckerle, 1998; Wang et al., 1999; Wang und Gilmore 2001). Der Name LIM leitet sich von den Anfangsbuchstaben der drei Proteine LIN-11, Isl1 und MEC-3 ab, in denen die konservierte LIM-Domänen Sequenz zuerst beschrieben wurde (Way und Chalfie, 1988; Freyd et al., 1990; Karlsson et al., 1990). Eine LIM-Domäne besteht aus einer cystein- und histidinreichen Aminosäuresequenz, die sich durch Koordination von zwei Zink-Atomen zu zwei tandemartigen Zinkfinger-Motiven ausbildet (Abb. 1B; Dawid et al., 1998; Jurata und Gill 1998; Kadrmas und Beckerle, 2004). Obwohl sich dieses Motiv dem DNA-bindenden Zinkfinger-Motive ähnelt (Perez-Alvarado et al., 1994), ist es nicht befähigt an die DNA zu binden (Wang und Gilmore, 2001). Die LIM-Domänen besitzen keine katalytische Aktivität, sondern dienen der Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen (Feuerstein et al., 1994; Schmeichel und Beckerle, 1994).

A)



B)



**Abb. 1: Trip6 und die allgemeine Struktur einer LIM-Domänen**

A) Schematische Darstellung von Trip6. Das nukleäre Exportsignal (NES, gelb) liegt zwischen den Aminosäuren 100 bis 107 und die drei LIM-Domänen (rot, blau und grün) befinden sich im carboxyterminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 279 bis 476. B) Schematische Darstellung des allgemeinen Zinkfingermotivs einer LIM-Domäne. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Zink-Atom (Zn) koordinierenden Aminosäuren Cystein (C), Histidin (H) oder Asparaginsäure (D) an.

Innerhalb des aminoterminalen Sequenzabschnitts von Trip6 befindet sich ein nukleäres Exportsignal, dessen Sequenz drei konservierte Leucine enthält. Wird das nukleäre Exportsignal durch Deletion der ersten 115 Aminosäuren entfernt, oder durch Austausch der einzelnen konservierten Leucine mutiert, akkumuliert Trip6 im Nukleus (Wang et al., 1999; Wang und Gilmore, 2001). Ebenso führt die Behandlung von Zellen mit Leptomycin B, einem spezifischen Inhibitor des Kernexport-Rezeptorproteins CRM1, zur Anreicherung von Trip6 im Zellkern (Kudo et al., 1998; Wang und Gilmore, 2001). Das nukleäre Exportsignal ist daher für den CRM1-abhängigen Export von Trip6 aus dem Nukleus und so für die Aufrechterhaltung der zytosolischen Lokalisation von Trip6 verantwortlich.

Im Zytoplasma liegt Trip6 mit Aktin-Filamenten assoziiert vor und ist Bestandteil von fokalen Adhäsionskomplexen, die für die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten zuständig sind (Wang et al., 1999; Cuppen et al., 2000; Yi et al., 2002). Der dynamische Auf- und Abbau der Adhäsionskomplexe sowie die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts sind essentielle Prozesse während der Zellmigration (Ridley et al., 2003) und werden durch zahlreiche Stimuli, wie zum Beispiel den Tumorpromotor Lysophosphatsäure (LPA) induziert (Mills und Moolenaar, 2003).

Einige der wichtigsten intrazellulären Proteine, die am Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionskomplexen beteiligt sind, sind die fokale Adhäsionskinase (FAK), Tyrosinkinasen der Src-Familie, sowie Paxillin und p130<sup>cas</sup> (Seufferlein und Rozengurt, 1994). Diese Proteine bilden Komplexe mit den in der Signalkaskade stromabwärts gelegenen Signalmolekülen Grb2 und Crk und regulieren so die adhäsionsinduzierte zelluläre Antwort (Hanks und Polte, 1997). Trip6 interagiert nach LPA-Behandlung von murinen Fibroblasten mit dem LPA<sub>2</sub>-Rezeptor, FAK, p130<sup>cas</sup> und Crk (Xu et al., 2004). Durch die c-Src-vermittelte Phosphorylierung des Aminoterminus von Trip6 an Tyrosin 55 wird diese Interaktion verstärkt. Die Phosphorylierung von Trip6 an dieser Position ist für die c-Src-abhängige Aktivierung des Rho/ERK (extrazellulär signalregulierter Kinasen) Signalwegs notwendig (Lai et al., 2005). Der Rho/ERK-Signalweg kontrolliert wichtige Komponenten der Zellmigration, einschließlich der Organisation der Aktin-Filamente (Ridley et al., 1992; Takaishi et al., 1993; Hotchin and Hall, 1995; Michiels et al., 1995). Die Reduktion der Trip6-Proteinmenge durch siRNA, als auch die Überexpression einer Trip6-Tyrosin 55-Mutante verringert die LPA-induzierte Zellmigration (Xu et al., 2004; Lai et al., 2005). Die posttranslationelle Modifikation des Aminoterminus von Trip6 durch Phosphorylierung spielt daher eine Rolle bei der positiven Regulation der Zellmigration.

Die dritte LIM-Domäne von Trip6 interagiert mit der humanen Tyrosinphosphatase PTP-1E und dem murinen homolog PTP-BL. Dies führt zu einer Trip6-abhängigen Rekrutierung von PTP-1E und PTP-BL zu den fokalen Adhäsionskomplexen (Murthy et al., 1999; Cuppen et al., 2000). Bisher ist die Funktion dieser Rekrutierung nicht geklärt. Es wird jedoch postuliert, dass Trip6 ein Substrat dieser Tyrosinphosphatasen ist, wodurch der Auf- und Abbau der fokalen Adhäsionskomplexe reguliert werden könnte.

Ein weiteres Beispiel für die Rolle von Trip6 im Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionskontakten ist die Interaktion mit Supervillin. Das Protein Supervillin begünstigt Prozesse, die zum Abbau von fokalen Adhäsionskomplexen und somit zum Verlust vom Zell-Substrat-Kontakt führen. Obwohl dieser Prozess ebenfalls noch nicht aufgeklärt ist, wurde gezeigt, dass die LIM-Domänen von Trip6 für die Rekrutierung von Supervillin an die fokalen Adhäsionskontakte essentiell sind. Die Reduktion der Trip6-Expression durch siRNA erhöht die Adhäsion der Zellen zur umgebenden Matrix (Takizawa et al., 2006) und sollte daher zu einer verringerten Zellmigration führen.

Das Protein Endoglin ist an der Regulation der Aktin-Filament-Organisation in Endothelzellen involviert und interagiert mit den LIM-Domänen von Trip6. Endoglin rekrutiert Trip6 an die Aktinfilamente und reguliert die korrekte Organisation der Aktin-Filamente in Trip6-abhängiger Weise. Wie diese Regulation erfolgt, ist jedoch unbekannt. In Endothelzellen, in denen die Trip6 Expression durch siRNA reduziert wird, kommt es zu Störungen in der Aktin-Filament-Struktur (Sanz-Rodriguez et al, 2004), was ebenfalls zu einer verringerten Zellmigration führen könnte.

Diese Studien zeigen, dass Trip6 die Migration von Zellen in positiver Weise reguliert. In anderen Zellkulturexperimenten wurde jedoch auch gezeigt, dass die Zellmigration durch die Trip6-Expression negativ beeinflusst werden kann. Die Rolle von Trip6 bei der Regulation der Aktin-Reorganisation wurde in humanen epithelialen Karzinom-Zelllinien untersucht. Hier resultierte die Reduzierung der Trip6-Expression durch siRNA in einer Zunahme der Aktinfilamente und in einer gesteigerten Zellmigration. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die epithelialen Zellen mit verminderter Trip6-Expression eine fibroblastenähnliche Morphologie einnahmen (Gur'ianova et al., 2005). Demnach ist Trip6 in dem hier untersuchten Zelltyp für die Inhibition der Zellmigration verantwortlich. Eine Trip6-vermittelte Inhibition der Zellmigration wurde auch in murinen Fibroblasten beobachtet. Hier führte die Überexpression von Trip6 zu einer verminderten Zellmigration (Yi et al., 2002).



Experimente mit infizierten Makrophagen haben ebenfalls gezeigt, dass Trip6 an der negativen Regulation der Zellmigration beteiligt ist. Das Gram-negativ Bakterium *Salmonella thyphimurium* nutzt Makrophagen als Wirtszelle und verbreitet sich innerhalb des Organismus durch die Steigerung der Zellmigration des Wirts. Das von *Salmonella thyphimurium* sezernierte Protein SrfH interagiert mit den LIM-Domänen von Trip6 und blockiert so seine Adapterfunktion. Dies führt zur gesteigerten Migration von *Salmonella thyphimurium*-infizierten Makrophagen (Worley et al., 2006).

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien zeigen, dass es sich bei dem LIM-Domänen-Protein Trip6 um einen Modulator der Zellmotilität handelt. Für diese Funktion spielen sowohl die LIM-Domänen, als auch der Aminoterminus (prä-LIM-Domänen-Region) von Trip6 eine entscheidende Rolle. Ob die beobachteten Unterschiede in der Regulation der Zellmigration durch Trip6 auf zelltyp- oder stimulusspezifische Unterschiede zurückzuführen sind, ist bislang nicht bekannt. Ebenso wurde die Rolle von Trip6 als Adhäsionsmolekül *in vivo* bislang noch nicht untersucht. Es wäre daher sehr interessant, mögliche Trip6-abhängige Migrationsphänotypen in der Maus zu analysieren, um erstmals Erkenntnisse über die Funktion von Trip6 *in vivo* zu gewinnen.

## 1.2 Die nukleäre Trip6 Isoform – nTrip6

Als Bestandteil von Zellmembran-assoziierten Multiproteinkomplexen ist Trip6 ein zytosolisches Protein. Interessanterweise wurden aber auch Protein-Protein-Interaktionen zwischen Trip6 und nukleären Proteinen beschrieben (Lee et al., 1995; Zhao et al., 1999; Yi et al. 2002; Kassel et al., 2004). Screening-Verfahren, die auf dem Hefe-Zwei-Hybrid-System basieren, haben sowohl den Retinsäurerezeptor (RXR) als auch den Thyroidhormon-Rezeptor (TR) und den Glukokortikoidrezeptor (GR) als Trip6-interagierende Proteine identifiziert (Lee et al., 1995; Schneider, 2001).

Bei diesen Proteinen handelt es sich um Mitglieder der nukleären Hormonrezeptor-Familie (Beato, 1989; Mangelsdorf et al., 1995). RXR und TR sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die bereits ohne Aktivierung durch ihre Liganden im Nukleus lokalisiert sind (Giguere, 1990; Stunnenberg, 1993). Der GR ist ebenfalls ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der jedoch erst nach Bindung an Glukokortikoidhormone im Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird und dort durch Bindung an DNA oder andere Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene reguliert (Pratt und Toft, 1997).

Das längste Isolat, das aus dem GR-Proteininteraktions-Screen hervorging, kodiert die Trip6 Aminosäuresequenz von 190 bis 476. Trip6<sup>190-476</sup> fehlt das nukleäre Exportsignal und zeigt in Überexpressionsstudien eine ausschließlich nukleäre Lokalisation (Kassel, unveröffentlichte Daten). Dem Trip6-Isolat aus dem RXR- und TR-Proteininteraktions-Screen fehlt ebenfalls das nukleäre Exportsignal (Lee et al., 1995). Demzufolge sollte Trip6 nur dann mit diesen nukleären Hormonrezeptoren interagieren können, wenn Trip6 im Nukleus lokalisiert ist.

Trip6<sup>190-476</sup> wurde als Antigen zur Produktion von polyklonalen Trip6 Antikörpern verwendet, die für die Untersuchung der zellulären Lokalisation von Trip6 nach Glukokortikoidhormon-Behandlung dienen sollten (Schneider, 2001; Kassel et al., 2004). Hierbei zeigte sich, dass sich die zytosolische Lokalisation von Trip6 nach Glukokortikoidhormon-Behandlung nicht ändert. Interessanterweise zeigte sich ebenfalls, dass neben Trip6 eine kleinere Trip6 Isoform (nTrip6) existiert, die ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist. Die nTrip6 Isoform interagiert mit dem Liganden-aktivierten GR im Nukleus (Kassel et al., 2004). Aufgrund der Daten des RXR- und TR-Proteininteraktions-Screens (Lee et al., 1995) wäre es möglich, dass nTrip6 auch mit diesen Hormonrezeptoren interagiert.

Neben dem nukleären Rezeptor GR sind zwei weitere Transkriptionsfaktoren bekannt, die mit nTrip6 interagieren (Kassel et al., 2004): c-Fos, ein Mitglied der AP-1-Familie und p65, welches der NF-κB-Familie angehört. Beides sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die nach Dimerisierung mit verschiedenen Mitgliedern der jeweiligen Proteinfamilie in der Lage sind, an verschiedene Promotorstrukturen zu binden und dadurch eine Vielzahl an Zielgenen regulieren können (Sen und Baltimore, 1986; Angel und Karin, 1991). AP-1- und NF-κB-abhängig aktivierte Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Tumorentstehung sowie im Immunsystem und bei Entzündungsreaktionen (Ghosh et al., 1998; Jochum et al., 2001; Greten und Karin, 2004; Wagner und Eferl, 2005).

In Promotorstudien an AP-1- und NF-κB-Zielgenen konnte gezeigt werden, dass nTrip6 mit DNA-gebundenem c-Fos und p65 interagiert und für die AP-1- und NF-κB-abhängige Expression dieser Gene benötigt wird (Kassel et al., 2004). Die nukleäre Form von Trip6 erfüllt somit eine Koaktivator-ähnliche Funktion für diese Transkriptionsfaktoren. Wie genau nTrip6 die Transkriptionsaktivität von AP-1 und NF-κB erhöht, wurde jedoch bislang nicht geklärt. Da der Aminoterminus von Trip6 keine katalytische Aktivität zeigt und die Trip6 LIM-Domänen selbst keine katalytische Aktivität besitzen (Feuerstein et al., 1994;

Schmeichel und Beckerle, 1994), wird vermutet, dass nTrip6 als Adapterprotein für andere Koaktivatoren dient (Kassel et al, 2004).

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Gene, deren Expression durch AP-1 und NF- $\kappa$ B erhöht wird, durch Glukokortikoide reprimiert werden können (Herrlich, 2001). Da die meisten Gene, die für pro-inflammatorisch wirkende Proteine kodieren, durch AP-1 und/oder NF- $\kappa$ B aktiviert werden, wird die negative Regulation der Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren durch den GR als eine wichtige Ursache für die entzündungshemmenden Wirkungen der Glukokortikoide vermutet.

Studien zur Aufklärung des Mechanismus der Glukokortikoid-abhängigen Repression von Entzündungsgenen haben gezeigt, dass der GR die Aktivität von AP-1 und NF- $\kappa$ B mittels Protein-Protein-Interaktionen am Zielpromotor inhibieren kann (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Brostjan et al., 1997; McKay und Cidlowski, 1999). Dieser Mechanismus wird als GR-vermittelte Transrepression bezeichnet und erfordert keine Bindung des GR an die DNA (Heck et al., 1994; Reichardt et al., 1998). Ebenso wird die Fähigkeit der reprimierten Transkriptionsfaktoren, an die DNA zu binden, nicht gestört (König et al., 1992; Nissen und Yamamoto 2000; Rogatsky et al., 2001). Mehrere Hinweise existieren, die daraufhin deuten, dass die Interaktion zwischen dem GR und AP-1 bzw. NF- $\kappa$ B indirekt ist und durch zusätzliche Faktoren vermittelt wird (Herrlich, 2001). Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitationsanalyse ist es gelungen, zu zeigen, dass der Liganden-aktivierte GR nur dann an die Promotorregion von AP-1- und NF- $\kappa$ B-Zielgenen binden kann, wenn nTrip6 mit AP-1 bzw. NF- $\kappa$ B assoziiert ist. Diese Interaktion zwischen dem GR und nTrip6 ist darüber hinaus Voraussetzung für die Fähigkeit des GR, die Promotoraktivierung dieser Gene zu reprimieren (Kassel et al., 2004).

Die Bindung von nTrip6 an c-Fos und p65 dient folglich nicht allein der positiven Modulation dieser Transkriptionsfaktoren, sondern auch der Rekrutierung des Glukokortikoidrezeptors an den Promotor ihrer Zielgene und vermittelt so auch die Glukokortikoid-abhängige Repression von AP-1- und NF- $\kappa$ B-regulierten Genen.

Die Bedeutung der Rolle von nTrip6 als Schlüsselprotein in der Modulation AP-1-, NF- $\kappa$ B- und GR-regulierten Genexpression *in vivo* wurde bislang noch nicht untersucht. Um die physiologische Relevanz der Protein-Protein-Interaktionen von nTrip6 im Zellkern sowie die von Trip6 im Zytoplasma bestimmen zu können, ist es erforderlich die Funktionen der

einzelnen Trip6-Isoformen unabhängig von einander analysieren zu können. Dies ist jedoch nur durch selektive Inaktivierung der Funktion des jeweiligen Proteins möglich. Da die Aminosäuresequenz von nTrip6 bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte, können die Trip6 und nTrip6 Funktionen *in vivo* derzeit nur durch Generierung einer konditionell *trip6*-defizienten Mauslinie untersucht werden.

### 1.3 Molekulare Mechanismen die zur Bildung von nTrip6 führen könnten

Die Aminosäuresequenz des nTrip6 Proteins konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Alle Versuche die nTrip6 Aminosäuresequenz anhand von etablierten Methoden wie beispielsweise der Massenspektroskopie zu identifizieren, schlugen fehl (eigene Vorarbeiten). Der Grund hierfür lag darin, dass anhand der polyklonalen Trip6<sup>190-476</sup> Antikörper, die erforderliche nTrip6 Proteinmenge aus Zellen nicht isoliert werden konnte. Es lässt sich jedoch eine theoretische nTrip6 Aminosäuresequenz ableiten, die auf den Charakteristika der Trip6 Aminosäuresequenz beruht.

Das nukleäre Exportsignal von Trip6 ist verantwortlich für seine zytosolische Lokalisation. Die Deletion oder Mutation des nukleären Exportsignals führt zur Akkumulation von Trip6 im Nukleus (Wang et al., 1999; Wang und Gilmore 2001). Da nTrip6 ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist, könnte der nTrip6 Aminosäuresequenz das nukleäre Exportsignal fehlen. Die Immunhybridisierung mit polyklonalen Antikörpern gegen die aminoterminalen Trip6 Aminosäuren 10 bis 25 zeigt keine kleineren Trip6 Isoformen (Yi et al., 2001). Dies spricht dafür, dass nTrip6 diese Aminosäuren nicht besitzt. Trip6 als auch nTrip6 immunhybridisieren mit den polyklonalen anti-Trip6<sup>190-476</sup> Antikörpern (Kassel et al., 2004). Das nTrip6 Protein enthält daher Epitope, die dem Trip6<sup>190-476</sup> Antigen entsprechen. Die LIM-Domäne eins von Trip6<sup>190-476</sup> interagiert *in vitro* mit c-Fos und p65 und die LIM-Domänen zwei und drei interagieren mit GR. Die Überexpression einer Trip6<sup>190-476</sup> LIM-1 Mutante hat einen dominant negativen Effekt auf die Aktivität von AP-1 und NF-κB. Die Überexpression einer Trip6<sup>190-476</sup> LIM-3 Mutante hat einen dominant negativen Effekt auf die GR vermittelte Transrepression von AP-1 und NF-κB (Schneider, 2001; Kassel et al., 2004; Heilbock, 2005). Dies spricht dafür, dass nTrip6 die Aminosäuresequenz der drei Trip6 LIM-Domänen enthält.

Zusammengenommen sprechen die Befunde dafür, dass nTrip6 alle drei LIM-Domänen besitzt. Abschnitte der aminoterminalen Region von Trip6, einschließlich des nukleären Exportsignals, sind jedoch vermutlich nicht enthalten. Die Frage ist, durch welchen

molekularen Mechanismus führt die *trip6*-Genexpression zu einer nTrip6 Isoform, die diese Charakteristika erfüllt?

Die Gene höherer eukaryotischer Zellen liegen in Form von exonischen und intronischen Sequenzen vor, die ebenfalls in ihren primären Transkripten, den prä-mRNAs, zu finden sind. Der Mechanismus des Spleißens von prä-mRNA wurde sehr detailliert bestimmt (Jurica and Moore, 2003; Nilsen, 2003). Das Spleißen entfernt intronische Sequenzen, die in der prä-mRNA durch konservierte Sequenzen der 5'- und 3'-Spleißstellen sowie der *branchpoint*-Sequenz definiert sind (Sharp, 1994). Das *trip6*-Gen besteht aus neun Exons und acht Introns. Die Trip6 mRNA wird durch Spleißen aller acht Introns des primären *trip6*-Gen Transkripts gebildet (Yi und Beckerle, 1998; Murthy et al., 1999; Wang et al., 1999).

Das alternative Spleißen von prä-mRNA ist einer der wichtigsten molekularen Mechanismen die zur Bildung von Protein-Isoformen und deren funktionelle Vielfalt beiträgt. Bei diesem Prozess können beispielsweise exonische Sequenzen ganz oder nur teilweise aus der prä-mRNA entfernt werden, um zwei oder mehr mRNA Transkripte (Spleißvarianten) von einem einzigen Gen zu generieren (Stamm et al, 2005). Die Häufigkeit des alternativen Spleißens wurden durch Analysen von EST (*expressed sequence tag*) Datenbanken untermauert, die zeigen, dass 35-60 % aller humanen Genprodukte alternativ gespleißt werden (Mironov et al., 1999; Brett et al., 2000; Kan et al., 2001; Modrek et al., 2001). Das alternative Spleißen ist daher vermutlich nicht die Ausnahme sondern die Regel. Im Gegensatz zum konventionellen Spleißen, können für das alternative Spleißen bisher keine eindeutigen Konsensussequenzen definiert werden (Black, 2003). Daher ist es nicht möglich bestimmte alternative Spleißmuster anhand von genomischen Sequenzen vorherzusagen. Die akkurate Erkennung von Spleißstellen ist das Ergebnis eines kombinatorisch regulierten Mechanismus der Zelle (Smith and Valcarcel, 2000). In EST-Datenbanken, wie dbEST (Boguski et al., 1993) lassen sich unterschiedliche Trip6 Spleißvarianten finden, was darauf hin deutet, dass nTrip6 durch alternatives Spleißen gebildet werden könnte. Das nukleäre Exportsignal von Trip6 ist innerhalb von Exon drei kodiert und die Exons sechs bis neun kodieren die drei LIM-Domänen. nTrip6 könnte daher durch alternatives Spleißen im Bereich der ersten fünf Exons gebildet werden.

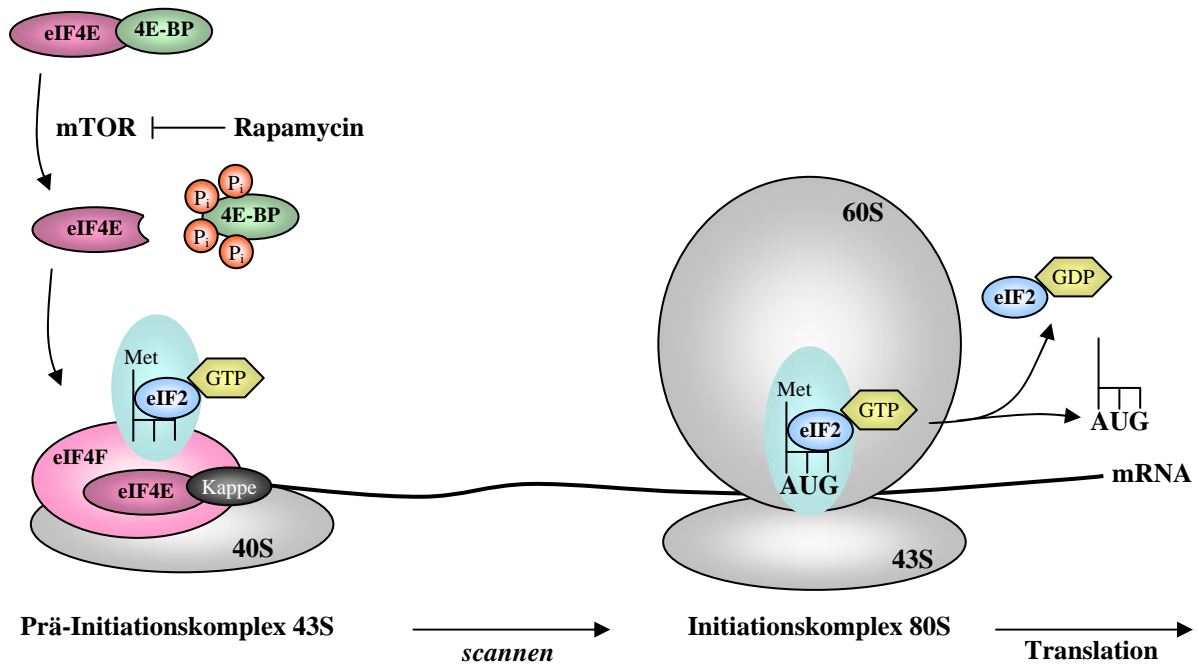
Die Translation von mRNA zum Protein repräsentiert den finalen Schritt der Genexpression. Neben dem alternativen Spleißen ist die Regulation der Translation ein weiterer essentieller Mechanismus, der die Genexpression in vielen biologischen Prozessen moduliert (Wickens et

al., 2000). Die Sequenz einer mRNA besteht in 5'-3'-Richtung aus der m7G- (7-Methylguanosin) mRNA-Kappe, der 5'-UTR, dem offenen Leseraster (ORF), der 3'-UTR und dem poly(A)-Ende. Alle Elemente tragen signifikant zur Translationseffizienz bei, wobei das ORF selbst meist nicht daran beteiligt ist. Die Translation beginnt im Allgemeinen, wie auch im Fall von Trip6 (Yi und Beckerle 1998; Wang et al., 1999), am 5'-proximalen Initiationskodon AUG (Kozak, 1986).

Der vorwiegende Mechanismus durch den Ribosomen das Initiationskodon einer mRNA erkennen ist der *scanning* Prozess (Kozak, 1978). Er kann in zwei entscheidende Schritte unterteilt werden: (1) die Rekrutierung des Prä-Initiationskomplexes 43S an die 5'-mRNA-Kappe und (2) die Erkennung des 5'-proximalen-AUG Initiationskodons (Abb. 2).

Der Prä-Initiationskomplex 43S besteht aus dem ternären Komplex, der kleinen ribosomalen Untereinheit 40S und zahlreichen eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs). Der eIF4F Komplex bindet an die mRNA und ermöglicht die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit 40S an die mRNA. Der eIF4F Komplex beinhaltet das Kappenprotein eIF4E, das direkt mit der 5'-mRNA-Kappe interagiert. Die Beteiligung des Kappenproteins eIF4E ist ein limitierender Faktor der Translationsinitiation und ist daher reguliert (Dever, 2002). Das Kappenprotein eIF4E wird durch Interaktion mit 4E-Bindeproteinen (4E-BPs) in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Freisetzung von eIF4E erfolgt nach Phosphorylierung der 4E-BPs durch unterschiedliche Kinasen (Gingras et al., 2001a), insbesondere durch die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Gingras et al. 2001b). Die Inhibition von mTOR durch Rapamycin verhindert die mRNA-kappenabhängige Translation, indem die Freisetzung von eIF4E verhindert wird (Beretta et al., 1996). Der ternäre Komplex besteht aus der Methionin-beladenen Initiator tRNA, die das Startkodon AUG während der Initiation erkennt und aus eIF2, das an GTP gebunden ist.

Der Bildung des Prä-Initiationskomplexes 43S folgt das Lesen (*scannen*) des 43S Komplexes entlang der mRNA, in 5'-3'-Richtung, bis das erste Startkodon AUG erkannt wird (Kozak, 1999). Das Startkodon wird durch Basenpaarung der Initiator tRNA erkannt und leitet die Hydrolyse des eIF2 und anderer eIF gebundener GTPs ein. Diese Reaktion entlässt die meisten eIFs einschließlich eIF2 aus dem 43S Komplex. Daraufhin wird die große ribosomale Untereinheit 60S an den 43S Komplex rekrutiert und bildet das 80S Ribosom am Startkodon. Mit der Bildung des 80S Ribosoms beginnt die Translation (Pestova et al., 2000; Shin et al., 2002).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der kappenabhängigen Translationsinitiation**

Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E) wird durch Bindung an 4E-Bindeproteine (4E-BPs) gebunden. Die Phosphorylierung von 4E-BPs durch Kinasen, insbesondere durch mTOR (*mammalian target of Rapamycin*), entlässt eIF4E aus dem Komplex. Die Aktivität von mTOR kann durch Rapamycin gehemmt werden. Das freie eIF4E bindet als Teil des eIF4F Komplexes an die 5'-mRNA-Kappe und rekrutiert die kleine ribosomale Untereinheit 40S an die mRNA. Zusammen mit dem ternären Komplex (blau) hat sich der Prä-Initiationskomplex 43S gebildet. Der 43S Komplex liest dann in 5'-3'-Richtung bis zur Erkennung des Startkodons AUG durch Basenpaarung der Initiator tRNA im ternären Komplex. Dies führt zur Hydrolyse des eIF2 gebundenen GTPs und zur Freisetzung von eIF2 und der tRNA. Die große ribosomale Untereinheit 60S kann jetzt an den 43S Komplex rekrutiert werden, der Initiationskomplex 80S bildet sich und die Translation beginnt (aus Calkhoven et al., 2002; Gebauer und Hentze, 2004).

Bei vielen eukaryotischen mRNAs wird durch den *scanning* Prozess ausschließlich das erste 5'-proximalen AUG Initiationskodon erkannt (Kozak, 1989). Hierbei liegt das Startkodon AUG in der optimalen Konsensussequenz **CCRCCAAUGG** (Das A des unterstrichenen Startkodons ist als +1 definiert). Die am stärksten konservierten Nukleotide sind **R** (A oder G) bei -3 und **G** bei +3 (Kozak, 1981, 1984, 1986).

Die alternative Translationsinitiation an einer einzigen mRNA ist neben dem alternativen Spleißen ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zur Bildung von Protein-Isoformen unterschiedlicher Funktion beiträgt (Kozak, 2002). Eine Art der alternativen Translation tritt in mRNA-Kappen-unabhängiger Weise durch interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) auf. Dieser Mechanismus wurde erstmals in viralen Genomen beschrieben und später ebenfalls in einer wachsenden Zahl von zellulären mRNAs (Hellen und Sarnow, 2001). Die zweite Art der

alternativen Translationsinitiation wird durch das *leaky* ribosomale *scanning* (LRS) in mRNA-kappenabhängiger Weise vermittelt. In diesem Fall liegt das 5'-proximale Startkodon AUG nicht in einer optimalen Konsensussequenz und führt zum LRS. Bei dem LRS findet sowohl Translationsinitiation am ersten AUG als auch eine alternative Initiation an einem oder mehreren stromabwärts gelegenen Startkodons statt (Kozak, 2002). Die alternative Translationsinitiation durch LRS kann ebenfalls an so genannten nicht-AUG Startkodons (CUG) erfolgen (Touriol et al., 2003). In beiden Fällen kann die alternative Translationsinitiation zur Bildung von aminoterminal trunkierten Protein-Isoformen beitragen. Da nTrip6 vermutlich die Trip6 aminoterminal Region einschließlich des nukleären Exportsignals nicht besitzt, wäre es ebenfalls möglich, dass nTrip6 durch alternative Translationsinitiation an der Trip6 mRNA entsteht.

Die Identifizierung des molekularen Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt, würde es ermöglichen die Funktionen der Trip6-Isoformen voneinander getrennt zu untersuchen. Dies könnte zum einen *in vivo* durch Generierung Trip6- oder nTrip6-defizienter Mauslinien erfolgen, oder *in vitro* durch Rekonstitution von Zellen einer konditionell *trip6*-defizienten Mauslinie, die in dieser Arbeit generiert werden soll.

## 1.4 Die konditionelle Inaktivierung von Genen

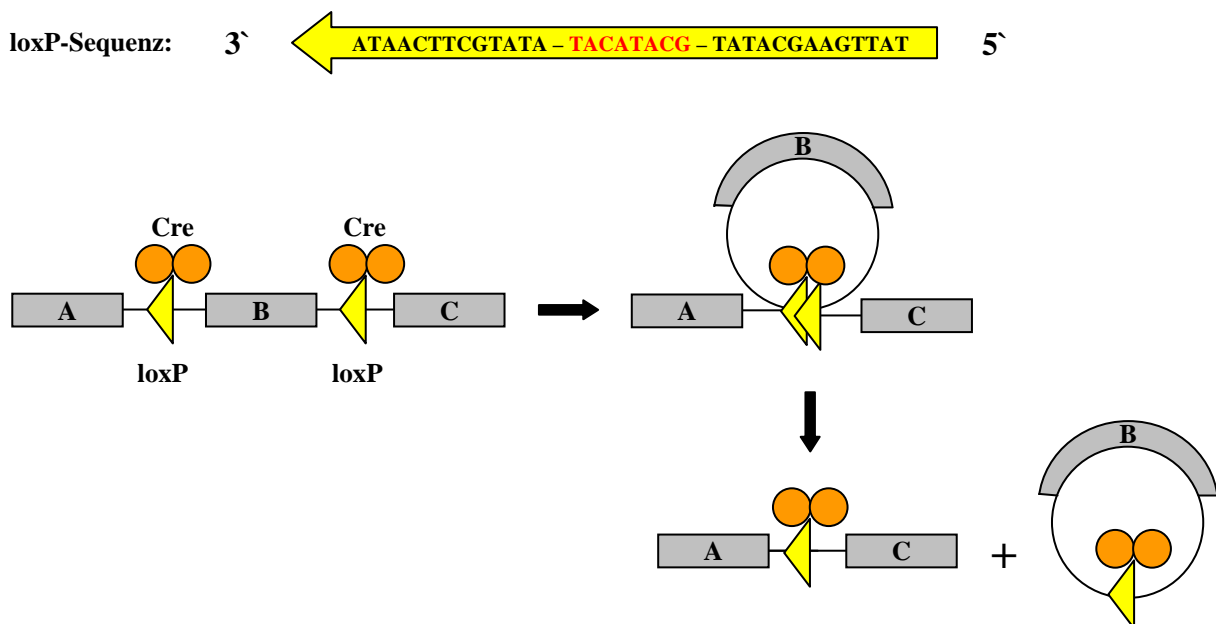
Die Gen-*targeting*-Methode dient neben anderen Anwendungsmöglichkeiten der Generierung von gendefizienten Mäusen, so genannten *knockout*-Mäusen, die zur Untersuchung der Genfunktion *in vivo* verwendet werden. Hierfür werden sequenzspezifische Mutationen an bestimmte Stellen des Mausgenoms durch den Prozess der homologen Rekombination eingeführt. In Säugetierzellen ist die homologe Rekombination von genomischer DNA mit fremder DNA im Vergleich zur zufälligen Integration ein sehr seltener Prozess. Die bisher einzige effiziente Methode zur Einführung von fremder DNA, ist die Verwendung von pluripotenten murinen embryonalen Stammzelllinien (ES-Zellen). Durch die Verwendung von ES-Zellen können homolog rekombinierte ES-Zellklone *in vitro* generiert und selektioniert werden. Die genspezifisch mutierten ES-Zellklone werden anschließend durch Injektion in Blastozysten eingebracht, wo sie sich bei der Entwicklung der Maus beteiligen. Hierbei können sie sich zu allen Zelllinien, einschließlich der Keimbahnzelllinie differenzieren und tragen so zur Entwicklung einer genetisch chimären Maus bei. Die weitere Verpaarung dieser Chimären erlaubt die Generierung von Nachkommen mit der genspezifisch eingeführten Mutation.



Bei der konditionellen Gen-*targeting*-Methode werden bestimmte genmodifizierende Sequenzen in den vorgesehenen Genloкус eingeführt, die es erlauben das betroffene Gen zu einem definierten Zeitpunkt in bestimmten Zelllinien der Maus zu deletieren. Dadurch ist es möglich die Funktion eines bestimmten Gens innerhalb verschiedener Entwicklungsstadien der Maus in definierten Zelllinien oder Geweben *in vivo* zu untersuchen. Für diesen Zweck wird das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet (Sauer, 1998; Lewandoski, 2001).

### 1.4.1 Die Cre-vermittelte Rekombination

Das Cre Protein ist das 38 kDa große Expressionsprodukt des Gens *cre* (*cause recombination*) im Bakteriophagen P1. Cre ist eine sequenzspezifische DNA-Rekombinase, die 34 Bp lange Sequenzen des P1 Genoms erkennt. Diese Sequenzen werden als loxP-Sequenzen (*locus of crossover* (x) in P1) bezeichnet. Die DNA-Rekombinase Cre katalysiert die konservierte Rekombination von DNA, die zwischen zwei loxP-Sequenzen liegt (Abb. 3).

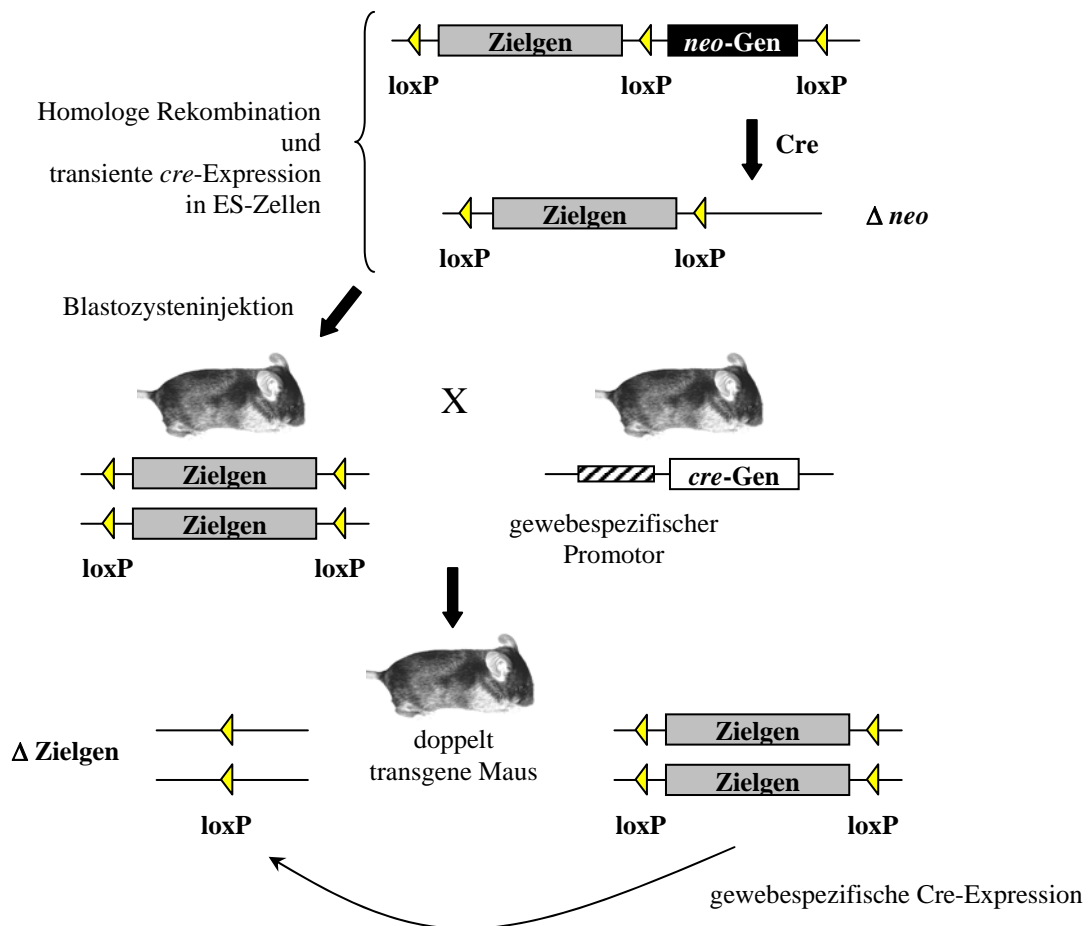


**Abb. 3: Schematische Darstellung der Cre-vermittelten DNA Rekombination**

Eine loxP Sequenz besteht aus zwei 13 Bp langen invertierten Sequenzwiederholungen (schwarz), die durch eine 8 Bp lange nicht palindromische Sequenz getrennt werden (rot). Diese Sequenz ist verantwortlich für die Orientierung der loxP-Sequenz (gelbe Pfeile). Die dimerisierte Cre-Rekombinase (orange) katalysiert die konservierte Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung über ein Holliday-Zwischenprodukt, wonach dann die Exzision der Sequenz B erfolgt und die Sequenzen A und C verbunden werden. Wenn die Sequenz B essentiell für die Funktion eines Gens ist, so führt diese Rekombination zur Inaktivierung des betroffenen Gens.

### 1.4.2 Generierung konditioneller Genmodifikationen

Die Verwendung des Cre/loxP-Systems erfordert die Generierung einer Mauslinie in der das zu deletierende Gen von zwei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung flankiert ist. Man spricht hierbei von einer Mauslinie mit einem geflochten Gen (von zwei loxP-Sequenzen flankiertes Gen). Zusätzlich wird eine transgene Mauslinie benötigt, die das Bakteriophagen Gen *cre* enthält. Zurzeit ist eine Vielzahl unterschiedlicher Cre-transgener Mauslinien kommerziell erhältlich, deren Cre-Expression wahlweise unter der Kontrolle verschiedener zellspezifischer Promotoren steht. Durch die Verpaarung der geflochten und *cre*-transgener Mauslinien wird eine konditionelle Mutante gebildet, in der die Exzision des geflochten Gens von dem räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster der Cre-Rekombinase abhängt (Abb. 4).

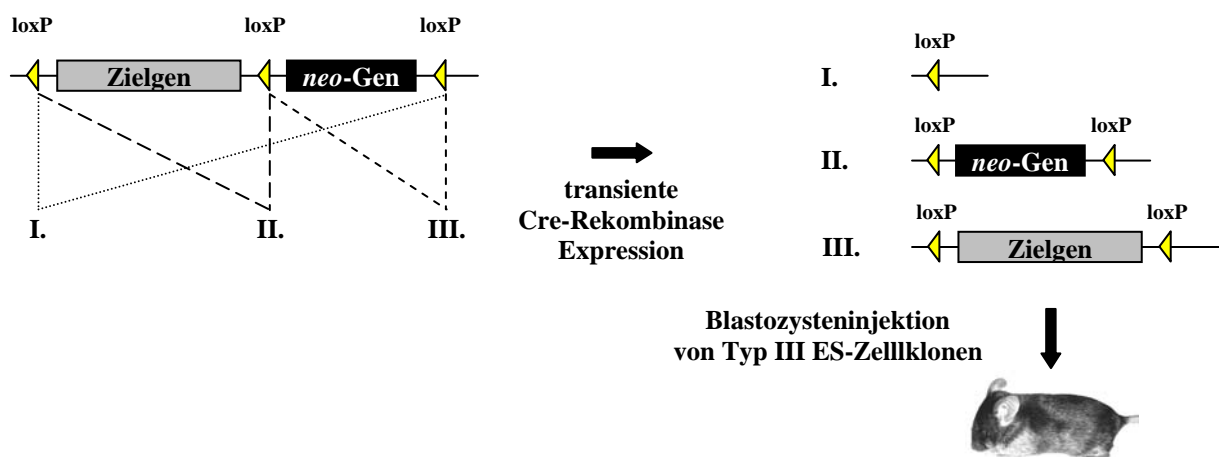


**Abb. 4: Konditionelle Gendeletion durch Cre-Rekombinase-Expression**

Das endogene Zielgen wird durch homologe Rekombination in ES-Zellen so modifiziert, dass es von zwei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung flankiert wird. In Fällen, in denen es erforderlich ist, das *neo* Gen zu entfernen, wird eine weitere loxP-Sequenz so inseriert, dass es durch transiente Cre-Rekombinase Expression in ES-Zellen deletiert werden kann. Nach der Identifizierung von Klonen, die das geflochte Zielgen enthalten, werden diese Klone zur Generierung der geflochten Mauslinie verwendet. Durch die Verpaarung der geflochten Mauslinie mit einer Cre-transgenen Mauslinie wird eine doppelt transgene Mauslinie generiert, in der das geflochte Zielgen durch die induzierbare Cre-Expression in bestimmten Geweben deletiert werden kann.

### 1.4.2.1 Die drei Rekombinationsereignisse nach transienter Cre-Expression

Die flox-und-Deletions-Methode ist die allgemein verwendete Strategie zur Generierung konditioneller Genmodifikationen in Mäusen und ist besonders nützlich, wenn die konventionelle Mutation des Zielgens zu einem embryonal letalen Phänotyp führt. Für die flox-und-Deletions-Methode werden *targeting*-Vektoren verwendet, die drei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung besitzen. Zwei dieser loxP-Sequenzen flankieren das Selektionsmarkergen Aminoglykosid-Phosphotransferase (*neo*), das der positiven Selektion von ES-Zellen dient die den *targeting*-Vektor in ihr Genom integriert haben. Die dritte loxP-Sequenz liegt isoliert innerhalb der homologen Sequenzen des Zielgens. Die transiente Cre-Expression in ES-Zellklonen mit dem homolog rekombinierten *targeting*-Vektor, führt zu drei unterschiedlichen Rekombinationstypen (Abb. 5). Die Rekombination der Selektionsmarkergen flankierenden loxP-Sequenzen hinterlässt eine loxP-Sequenz im Genom, die zusammen mit der dritten loxP-Sequenz das gefloxt Zielgen ergibt (III. Typ). Durch die Rekombination der Zielgen flankierenden loxP-Sequenzen bleibt das gefloxt Selektionsmarkergen im Genom zurück. Dieses Produkt ist nicht von praktischem Nutzen und wird anhand des verbliebenen Selektionsmarkergens aussortiert (II. Typ). Die Rekombination der zwei äußeren loxP-Sequenzen führt zur Deletion des Selektionsmarker- und Zielgens. Dieser Rekombinationstyp kann zur Generierung einer konventionellen Zielgen defizienten Mauslinie verwendet werden (I. Typ). Für die Generierung einer konditionell genmodifizierten Mauslinie werden nur ES-Zellklone verwendet, in denen der Cre-vermittelte Rekombinationstyp III stattgefunden hat.



**Abb. 5: Die drei Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse in homolog rekombinierten ES-Zellen.**

Die transiente Cre-Expression in homolog rekombinierten ES-Zellklonen führt zu drei unterschiedlichen Rekombinationsereignissen. Nur die Rekombination vom Typ III wird zur Generierung genmodifizierter Mäuse verwendet. Der Rekombinationstyp I stellt eine konventionelle Gendelektion dar.

## 1.5 Zielsetzung

Die LIM-Domänen-Proteine Trip6 und nTrip6 sind Protein-Isoformen der *trip6*-Genexpression, die in der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind (Kassel et al., 2004). Im Zytosol ist Trip6 über die LIM-Domänen mit Proteinen der fokalen Adhäsionskontakte assoziiert und moduliert die Zellmigration sowohl in positiver (Xu et al., 2004; Lai et al., 2005; Sanz-Rodriguez et al., 2004; Takizawa et al., 2006) als auch negativer Weise (Yi et al., 2002; Gur'ianova et al., 2005; Worley et al., 2006). Die nukleäre Trip6 Isoform nTrip6 ist ein Chromatin-assoziiertes Protein und besitzt eine Koaktivator-ähnliche Funktion für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B. Gleichzeitig spielt nTrip6 eine Schlüsselrolle in der GR-vermittelten Transrepression dieser Transkriptionsfaktoren (Kassel et al., 2004).

Bisher ist die Bedeutung der Trip6-Isoformen vermittelten Funktionen *in vivo* unbekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Generierung einer konditionell *trip6*-defizienten Mauslinie. Durch die konditionelle Inaktivierung des *trip6*-Gens können die Funktionen der Trip6-Isoformen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung und in bestimmten Geweben der Maus untersucht werden.

Da die Aminosäuresequenz von nTrip6 bisher unbekannt ist, können jedoch die Funktionen der Trip6-Isoformen weder *in vitro* noch *in vivo* voneinander getrennt untersucht werden. Alle Bemühungen nTrip6 in ausreichender Menge für eine Sequenzanalyse zu isolieren schlugen fehl (eigene Vorarbeiten). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher den molekularen Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt zu identifizieren. Durch diesen indirekten Weg sollte die nTrip6 Aminosäuresequenz identifiziert werden können. Die Identifizierung der nTrip6 Aminosäuresequenz ist essentiell für zukünftige differenzierte Untersuchungen von Trip6 und nTrip6 Funktionen *in vitro* als auch *in vivo*.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q-Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

##### Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid (30/0,8)  
 Adenosintriphosphat (ATP)  
 Agarose  
 Ammoniumchlorid  
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)  
 Ampizillin-Natriumsalz  
 Bacto-Agar  
 Blasticidin  
 Bromphenolblau  
 BSA (Rinderserum-Albumin)  
 Chloroform  
 Coelenterazin  
 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 Dithiothreitol (DTT)  
 Donor Kälber Serum (DCS)  
 EDTA  
 Endoporter  
  
 Ethidiumbromid  
 Formaldehyd  
 Formamid, deionisiert  
 Glucose  
 Glycerol  
 Glycin  
 Glycylglycin  
 Glykogen  
 Hefeextrakt  
 HEPES  
 Kanamycin  
 Lipofectamine 2000  
 Luziferin  
 Lysozym  
 Magermilchpulver  
 Magnesiumchlorid  
 Magnesiumsulfat  
 4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)  
 Natriumacetat  
 Natriumdodecylsulfat (SDS)  
 Nonidet P-40 (NP-40)

##### Bezugsquellen

Roth, Karlsruhe  
 Sigma, Taufkirchen  
 peqLab, Erlangen  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Otto Nordwald KG, Hamburg  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma, Taufkirchen  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Merck, Darmstadt  
 Byosinth, Gstaad, Schweiz  
 Sigma, Taufkirchen  
 Fluka, Neu-Ulm  
 Roth, Karlsruhe  
 Cambrex Bio Science, Apen  
 Roth, Karlsruhe  
 Gene-Tools, Philomath,  
 Oregon USA  
 Sigma, Taufkirchen  
 Merck, Darmstadt  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Sigma, Taufkirchen  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Sigma, Taufkirchen  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Roche, Mannheim  
 Roth, Karlsruhe  
 Saliter, Obergünzburg  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Roth, Karlsruhe  
 Sigma, Taufkirchen

Phenol	Invitrogen, Eggenstein
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma, Taufkirchen
Quik-Hyb	Stratagene, Heidelberg
Rapamycin	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tris base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Merck Biosciences GmbH, Darmstadt, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen und Roche Diagnostics, München bezogen.

### 2.1.2 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham, Freiburg
------------------------------------	--------------------

### 2.1.3 Zellkulturchemikalien für die embryonale Stammzellenkultur

2-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Glukose und HEPES Modifikation, flüssig	Sigma, Taufkirchen
Fötales Rinderserum (FBS)	Cambrex, Bioscience, Apen
Geneticin-Sulfat (G418)	Invitrogen, Eggenstein
L-Glutamin (MEM)	Gibco, Karlsruhe
Leukämischer Inhibitor Faktor (LIF)	Chemicon, Temecula, Kalifornien USA
Natrium-Pyruvat (MEM)	Gibco, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren (MEM)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
PBS	Gibco, Karlsruhe
Trypsin	Gibco, Karlsruhe

### 2.1.4 Kits

Easy-Pure Kit	Biozym, Oldenburg
Ready Prime Random Primer Labeling Kit	Amersham, Freiburg
TNT Transkriptions-/Translations-System	Promega, Mannheim
Qiagen-Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange Site-Directed Mutageneses Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Zero Blunt TOPO PCR Klonierungs-Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.5 Enzyme und sonstige Reagenzien

Alle verwendeten Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase und reverse Transkriptase wurden von der Firma Promega, Mannheim, bezogen. Protein- und DNA-Längenstandards und dNTP wurden von peqlab, Erlangen, bezogen.

### 2.1.6 Bakterienstämme

- E. coli* DH5 $\alpha$ : Rekombinationsdefekte, suppressive Linie  
Genotyp: F $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* ( $r_k^- m_k^+$ ) *phoA supE44*  $\lambda^-$  thi-1 *gyrA96 rel A1*  
Life Technologies, Katalognummer 18258-012
- E. coli* TOP10: chemisch kompetente Bakterien  
Genotyp: F $\Delta$ *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1 deoR araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*, im TOPO-Klonierungskit von Invitrogen enthalten, Katalognummer 2800-20
- E. coli* XL1-Blue: chemisch kompetente Bakterien  
Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F<sup>-</sup> *proAB lacIZM15 Tn10* (Tet)]  
Im Mutagenese-Kit von Stratagene enthalten, Katalognummer 200236

### 2.1.7 Zelllinien

- Cos-7: Transformierte Zelllinie aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze (Gluzman, 1981). Cos-7 wurden in DMEM mit 10% FBS kultiviert.
- E14.1: Pluripotente murine embryonale Stammzellen. Die E14.1 Linie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Zhao-Qi Wang, Jena zur Verfügung gestellt. E14.1 wurden in DMEM (HEPES modifiziert) mit 15% FBS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% Natrium Pyruvat, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol und 500  $\mu$ l LIF
- HeLa: Humane Zervixkarzinom Zelllinie. HeLa wurden in DMEM mit 10% FBS kultiviert.
- HM-1: Pluripotente murine embryonale Stammzellen des Mausstamms 129/Ola. Die HM-1 Linie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Erwin Wagner, Wien zur Verfügung gestellt. HM-1 wurden in DMEM (HEPES modifiziert) mit 15% FBS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% Natrium Pyruvat, 1% Glutamine, 1% Penicillin / Streptomycin, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol und 500  $\mu$ l LIF
- NIH-3T3: Murine embryonale Fibroblasten (*Swiss mouse embryo*). NIH-3T3 wurden in DMEM mit 10 % DBS kultiviert.
- NIH-3T3/Klon#24c: Murine embryonale Fibroblasten (*Swiss mouse embryo*), stabil transfiziert mit dem pXP-2 Plasmid (Nordeen, 1988), in dem das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des menschlichen Kollagenase I Promotors (-517 bis +63) steht (Schneikert et al., 1996). Der Klon #24c wurde in DMEM mit 10% DBS und 10 $\mu$ g/ml Blastidin kultiviert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Olivier Kassel.

### 2.1.8 Mausstämme

Adulte Mäuse des Stammes C57BL/6J wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und werden seit 1995 im Tier-Labor des ITG gezüchtet.

Alle Mäuse wurden im Tierlabor des ITG (Sicherheitsstufe S1, GenTG) unter konventionellen oder SPF-(*specific pathogen free*)-Bedingungen in einem 12 stündlichen Lichtzyklus gehalten. Die Aufzucht, Haltung und Tötung der Mäuse sowie die tierexperimentellen Studien wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

### 2.1.9 Oligonukleotidprimer

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, und Metabion, Martinsried, bezogen.

#### Primer für die RT-PCR-Analyse von humaner Trip6 mRNA

hT6\_120\_UTR\_for: 5`-cca gag gct cgg ggc ttc aa-3`  
 hT6\_458\_exon3\_rev: 5`-ctc ggc gtc cag gct tcc ag-3`  
 hT6\_657\_exon4\_rev: 5`-ggg tgc tgg cgg tag tgt aa-3`  
 hT6\_1024\_exon6\_rev: 5`-tct tct ccg cag cca cca ca-3`

#### Primer für die RT-PCR-Analyse von muriner Trip6 mRNA

HA\_for: 5`-ccc gac tac gcc agc ctg gg-3`  
 mT6\_127\_UTR\_for: 5`-gtg ggg acc ctg acc tct gt-3`  
 mT6\_548\_exon3/4\_rev: 5`-gcc tca aaa gcc tgt ctg tc-3`  
 mT6\_657\_exon4\_rev: 5`-ata gga ggc tgg ggt agg tc-3`  
 mT6\_1029\_exon5/6\_rev: 5`-gcc acc aca ccg acc aaa gt-3`

#### Primer für die Klonierung des *trip6* targeting-Vektors

mT6\_35934\_NheI: 5`-ccaggctagctgagaaaatgtcttacagctggatccc-3`  
 mT6\_33006\_AscI: 5`-ggggcgccgcccgtacctcggtagagct-3`  
 mT6\_33013\_AscI: 5`-ccaggcgccgcccataacttcgtataatgtatgctatacc-3`  
 mT6\_29127\_SalI: 5`-gggtcgacaagctttcaccagcctcatctgtgag-3`

#### Primer zur Kontrolle der 3. LoxP-Sequenz im langen Homologie-Arm

MT6g35995\_for: 5`-gaa cca aga cta cca gcc cag-3`  
 MT6g32712\_rev: 5`-cgg atg atc ccc ctg tct g-3`  
 MT6g33577\_for: 5`-gaa taa ggc ttg ggg cca cg-3`  
 loxP3\_rev: 5`-ctt cgt ata gca tac att ata gc-3`

#### Primer zur Klonierung der Probe stromabwärts des kurzen Homologie-Arms

Outprobe\_SA\_for\_27292: 5`-aaa atg gtg gga gga gat gc-3`  
 Outprobe\_SA\_rev\_26254: 5`-aag gaa acg aaa aga aaa at-3`

#### Primer zur Klonierung von Trip6-Konstrukten

mT6\_175\_EcoRI\_f2: 5`-caaggaattcatgtccggggccacctggctt-3`  
 mT6\_1617\_XhoI\_wostop: 5`-ggctcgagacaatcagtggtgacagtggtg-3`  
 hT6\_171\_EcoRI\_for: 5`-caaggaattcatgtcggggccacctggctg-3`  
 hT6\_1503\_XhoI\_wostop: 5`-ggctcgaggcagtcagtggtgacggtggctg-3`

#### Primer zur Mutation des murinen sekundären Trip6-Startkodons (AUG)

mT6\_ATG\_2a: 5`-gct gtt cca acc ccg acg etc cca gca tcc c-3`  
 mT6\_ATG\_2b: 5`-ccc tac gac cct cgc agc ccc aac ctt gtc g-3`



### 2.1.10 Northern Blot Proben

Humane Trip6 Probe (679 Bp):      Verdau des Plasmids HA-hT6\_CDS-V5 mit PstI  
Murine Trip6 Probe (580 Bp):      Verdau des Plasmids HA-mT6\_CDS-V5 mit ScaI / SacI

### 2.1.11 siRNA

Die siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

Trip6-siRNA (446 - 466)                      5`-cagucuggaugcugagauaga(dTdT)-3`  
Kontroll-siRNA (DsRed/drFP583)              5`-uuggagccguacuggaacu(dTdT)-3`

### 2.1.12 Morpholinos

Alle Morpholinos wurden von der Firma Gene-Tools, Philomath, Oregon USA bezogen. Die Kleinbuchstaben in den Kontrollmorpholinos stellen nicht-komplementäre Nukleotide dar.

muriner Trip6 Morpholino (151 bis 175)	ATGGTCTGGAATAGGGTTACTCCAC
muriner Trip6 Morpholino (159 bis 183)	GCCCGGACATGGTCTGGAATAGGGT
muriner nTrip6 Morpholino (480 bis 504)	GACCCCCGTCCAGATCAGCCAACAT
Kontroll-Morpholino K1 (151 bis 175)	ATGcTCTGcAATAcGGTaACTgCAC
Kontroll-Morpholino K2 (480 bis 504)	GAgCCCCcTCCAcATCAcCCAAGAT

### 2.1.13 Plasmidkonstrukte

#### pcDNA3.1(+)**HA**

Enthält das Hämagglutinin Epitop aus *Hämophilus influenza* mit vorangehender Kozak-Sequenz als HindIII / EcoRI-Fragment aus pCHB (Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Christine Heilbock, FLI Jena) Leserahmen: agc ctg gga att ctg cag ata tcc

#### pcDNA3.1(+)**HT6-HA**

Enthält die kodierende humane Trip6 Sequenz (NCBI Acc. Nr.: NM\_003302) als EcoRI / XhoI Fragment. Aminoterminal ist das HA-Epitop als HindIII / EcoRI Fragment in den Vektor inseriert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### pcDNA3.1(+)**MT6-HA**

Enthält die kodierende murine Trip6 Sequenz (NCBI Acc. Nr.: NM\_011639) als EcoRI / XhoI Fragment. Aminoterminal ist das HA-Epitop als HindIII / EcoRI Fragment in den Vektor inseriert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### pAC5.1(A) **hT6\_CDS-V5-His**

Enthält die kodierende humane Trip6 Sequenz ohne Stopkodon als EcoRI / XhoI Fragment, amplifiziert von pcDNA3.1(+)**HT6-HA** mit den Primern hT6\_171\_EcoRI\_for und hT6\_1503\_XhoI\_wostop. Carboxyterminal befindet sich die kodierende Sequenz des V-Protein-Epitop des Paramyxovirus (V5) des Affen im Trip6 Leseraster.

**pAC5.1(A) mT6\_CDS-V5-His**

Enthält die kodierende murine Trip6 Sequenz ohne Stopkodon als EcoRI / XhoI Fragment, amplifiziert von pcDNA3.1(+)MT6-HA mit den Primern mT6\_175\_EcoRI\_f2 und mT6\_1617\_XhoI\_wostop. Carboxyterminal befindet sich die kodierende Sequenz des V-Protein-Epitop des Paramyxovirus (V5) des Affen im Trip6 Leseraster.

**pcDNA3.1(+)HA-hT6\_CDS-V5**

Enthält die kodierende humane Trip6 Sequenz mit aminoterminalen HA- und carboxyterminalen V5-Epitop. Das EcoRI / PmeI Fragment des pAC5.1(A) hT6\_CDS-V5-His wurde in den pcDNA3.1(+)HT6-HA über die Schnittstellen EcoRI / EcoRV eingeführt.

**pcDNA3.1(+)HA-mT6\_CDS-V5 (Trip6-Expressionsplasmid)**

Enthält die kodierende murine Trip6 Sequenz mit aminoterminalen HA- und carboxyterminalen V5-Epitop. Das EcoRI / PmeI Fragment des pAC5.1(A) mT6\_CDS-V5-His wurde in den pcDNA3.1(+)MT6-HA über die Schnittstellen EcoRI / EcoRV eingeführt.

**pcDNA3.1(+)mT6\_CDS-V5**

Enthält die kodierende murine Trip6 Sequenz mit carboxyterminalen V5-Epitop. Das EcoRI / NotI Fragment des pcDNA3.1(+)HA-mT6\_CDS-V5-His wurde in einen pcDNA3.1(+) über die Schnittstellen EcoRI / NotI eingeführt.

**pcDNA3.1(+)182-mT6\_CDS-V5**

Enthält die kodierende murine Trip6 Sequenz ohne erstes Startkodon beginnend mit der Position 182. Diese Sequenz wurde durch einen HindIII / KpnI Verdau des pcDNA3.1(+)HA-mT6\_CDS-V5 entfernt.

**pcDNA3.1(+)mT6gHA (Klon\*2)**

Enthält die komplette murine genomische Trip6 Sequenz (NCBI Acc. Nr.: AF312033) von 33343 bis 29298 als EcoRI / XhoI Fragment. Aminoterminal ist das HA-Epitop als HindIII / EcoRI Fragment in den Vektor inseriert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

**pcDNA3.1(+)HA-mT6\_Minigen(wt)-V5**

Enthält die murine genomische Trip6 Sequenz des pcDNA3.1(+)mT6gHA (Klon\*2), aus der das carboxyterminale SacII / NotI Fragment entfernt und gegen das SacII / Not I Fragment der murinen kodierenden Trip6 Sequenz des pcDNA3.1(+)HA-mT6\_CDS-V5 ausgetauscht wurde.

**pcDNA3.1(+)HA-mT6\_Minigen(t308c)-V5**

Enthält die Sequenz des pcDNA3.1(+)HA-mT6\_Minigen(wt)-V5, in der das Thymidin 308 gegen ein Cytosin mittels den Primern mT6\_ATG\_2a und mT6\_ATG\_2b getauscht wurde.

**pcDNA3.1(+)182-mT6\_Minigen(wt)-V5**

Enthält die Sequenz des pcDNA3.1(+)HA-mT6\_Minigen(wt)-V5, in der die Sequenz vom HA-Epitop bis Position 182 durch einen Hind III / KpnI Verdau entfernt wurde.

**pcDNA3.1(+)182-mT6\_Minigen(t308c)-V5**

Enthält die Sequenz des mutierten pcDNA3.1(+)HA-mT6\_Minigen(t308c)-V5, in der die Sequenz vom HA-Epitop bis Position 182 durch einen Hind III / KpnI Verdau entfernt wurde.

#### **Kosmid #14**

Enthält einen Großteil des murinen Chromosoms 5 (NCBI Acc. Nr.: AF312033) inklusive des kompletten *trip6* Gens. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pTVFlox-0**

Enthält die Gene Thymidin-Kinase (*tk*) und Aminoglykosid-Phosphotransferase (*neo*), eine isolierte und zwei *neo* flankierende LoxP-Sequenzen. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des *Herpes simplex* Virus (HSV)-Promotors. Konstruiert von Dieter Riethmacher und Karin Gottschling. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pBluescript II SK (+) MT6XH6,8**

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz von 35934 bis 29127 als SpeI / Hind III Fragment aus dem Kosmid #14. Die KpnI Schnittstelle ist mutiert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pBluescript II SK (+) MT6SH1,65**

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz von 29126 bis 27476 als SpeI / Hind III Fragment aus dem Kosmid #14. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pBluescript II SK (+) MT6XH6,8\***

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz aus pBluescript II SK (+) MT6XH6,8, bei der eine zusätzliche SpeI Schnittstelle durch Mutation der Positionen t33008a und c33006t eingeführt wurde. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pBluescript II SK (+) MT6XH6,8\*LTNL**

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz aus pBluescript II SK (+) MT6XH6,8\*, bei der eine LoxP/*tk/neo*/LoxP (LTNL)-Kassette in die SpeI Schnittstelle eingeführt wurde. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Irene Huber.

#### **pCR-Blunt II-TOPO MT6NA2,92**

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz, die mit den Primern mT6\_35934\_NheI und mT6\_33006\_AscI von pBluescript II SK (+) MT6XH6,8\*LTNL amplifiziert wurden.

#### **pCR-Blunt II-TOPO MT6AS3,88**

Enthält die genomische murine Trip6 Sequenz, die mit den Primern mT6\_33013\_AscI und mT6\_29127\_SalI von pBluescript II SK (+) MT6XH6,8\*LTNL amplifiziert wurden.

#### **pTVFlox-*trip6***

Basiert auf pTVFlox-0 und enthält das *trip6* Gen. Die Exons zwei bis neun werden von zwei LoxP-Sequenzen flankiert und stromabwärts liegt das *neo* Gen gefolgt von einer weiteren LoxP-Sequenz. Die Klonierung von pTVFlox-*trip6* ist detailliert in Methoden 2.2.2 beschrieben.

#### **pCR-Blunt II-TOPO shortarm-Probe**

Enthält die murine genomische Trip6 Sequenz (NCBI Acc. Nr.: AF312033) von 27292 bis 26254 als EcoRI Fragment.

### **pMC-Cre**

Enthält das *cre* Gen als XhoI Fragment unter der Kontrolle des *Herpes simplex* Virus (HSV)-Thymidin Kinase (tk) Promotors. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Uta Möhle-Steinlein, IMP Wien).

## **2.1.14 Antikörper**

### **Antikörper**

### **Bezugsquellen**

#### **Primärantikörper**

Anti-Trip6<sup>190-476</sup>  
Anti-Trip6 BL453 (A300 – 335A)  
Anti-ZRP-1/Trip6, monoklonal Maus  
Anti-GR (NCL-GCR)  
Anti-GR (sc-1002)  
Anti-HA, monoklonal Ratte  
Anti-V5, monoklonal Maus

Genosys Biotechnologies, Pampisford, UK  
Bethyl, Montgomery, Texas, USA  
BD-Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA  
Novocastra, Newcastle, England  
Santa Cruz, Heidelberg  
Roche, Mannheim  
Invitrogen, Karlsruhe

#### **Sekundärantikörper**

Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert  
Anti-Maus, HRP-konjugiert  
Anti-Ratte, HRP-konjugiert  
Anti-Maus, FITC-konjugiert  
Anti-Ratte, TRITC-konjugiert

Dako, Hamburg  
Dako, Hamburg  
Dako, Hamburg  
Dako, Hamburg  
Dako, Hamburg

## **2.2 Methoden**

Sofern keine Angaben bezüglich der Quelle der verwendeten Methoden gemacht wurden, sind die Protokolle in Anlehnung an die Sammlung molekularbiologischer Standardmethoden von Maniatis et al., 1989 (*Molecular Cloning*) und Ausubel et al., 1989 (*Current Protocols in Molecular Biology*) durchgeführt worden. Bei Prozentangaben zur Zusammensetzung von Lösungen und Puffern handelt es sich, falls nicht anders vermerkt, um Volumenprozent (v/v).

### **2.2.1 Nukleinsäure-Methoden**

#### **2.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren**

Die Reinigung einer Nukleinsäurelösung von Proteinkontaminationen wurde in einem Mindestvolumen von 100 µl durchgeführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1x TNE gesättigt; 1x TNE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde das heterogene Gemisch vermenzt (Vortex). Durch zehnminütige Zentrifugation bei 12000 U/min wurde die Phasen-Trennung beschleunigt, wobei sich die Proteinfraction in der Interphase sammelt. Die wässrige, nukleinsäurehaltige Oberphase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Zur Beseitigung von Phenolresten wurde erneut mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die gereinigte Nukleinsäurelösung wurde dann zur weiteren Verwendung abgenommen.

#### **2.2.1.2 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen**

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen, wurde die Salzkonzentration mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8-5,0) auf eine Endkonzentration von 300 mM gebracht. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol wurde die DNA 15 Minuten bei -80°C oder mindestens 30 Minuten bei -20°C gefällt und durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 12 000 U/min sedimentiert. Zur Entfernung von Salz wurde das Präzipitat mit kaltem 75% Ethanol gewaschen, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in deionisiertem Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert.

### **2.2.1.3 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Durch Messung der OD bei einer Wellenlänge von 280 nm können Kontaminationen durch Proteine oder Phenol wahrgenommen werden. Bewegt sich der Wert des Verhältnisses von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  zwischen 1,8 bis 2,0, liegt der Reinheitsgrad der Lösung in einem annehmbaren Bereich.

### **2.2.1.4 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Enzymeinheit U (*Unit*) ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg DNA des Phagen Lambda ( $\lambda$ ) in einer Stunde vollständig verdaut. Für analytische und präparative Zwecke wurde DNA mit 2 bis 5 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA verdaut. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das zehnfache des Volumens der zugesetzten glyzerinhaltigen Enzymlösung. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden oder über Nacht in Gegenwart der vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### **2.2.1.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach Fragmentgröße erfolgte die Separation von DNA-Fragmenten in Gelen mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 2% (w/s). Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7,2, 2mM Natriumazetat, 1mM EDTA) durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben und die Agarose wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet und die mit DNA-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 0,1% (w/v) SDS, 50% Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) versetzten Proben wurden in die ausgesparten Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde dabei auch ein geeigneter DNA-Längenstandard (fragmentierte  $\lambda$ -DNA) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V (35-45 mA). Unter Verwendung eines Transilluminators (IL-350, Bachofer, Reutlingen) konnte die DNA mit UV-Licht der Wellenlänge von 320 nm bestrahlt, sichtbar gemacht und anschließend photographiert werden.

#### **2.2.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die Bande eines entsprechenden DNA-Fragments wurde unter langwelligem UV-Licht lokalisiert, mit einem Skalpell knapp aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Volumen des Gel-Stücks anhand des Gewichts bestimmt (100 mg = 100 µl). Die Isolierung der DNA aus dem TAE-Gel erfolgte durch Verwendung des *DNA Purification Kits Easy Pure* der Firma Biozym Diagnostik (Oldenburg). Dabei wurde das Gel-Stück nach Zugabe des 3-fachen Volumens Natriumiodid-Lösung (6 M NaI, 60 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> wasserfrei) bei 55°C geschüttelt bis die Agarose vollständig gelöst war. Unter diesen Salzbedingungen ist es möglich, die DNA an Glasmilch zu binden. Nach mehrmaligem Waschen (Wasch-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 50% Ethanol) wurde die DNA mittels deionisiertem Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) von der Glasmilch eluiert. Die Elution wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### **2.2.1.7 Ligation von Nukleinsäurefragmenten**

Ligationsreaktionen erfolgten in Ligasepuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) über Nacht bei 16°C oder für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur, wobei pro µg DNA 3 Einheiten T4 DNA Ligase eingesetzt wurden. Zur weiteren Analyse wurden 10 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

#### **2.2.1.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterien**

Zur Vermehrung eines bestimmten Plasmids wurden 100-200 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,01-1 µg DNA oder 10 µl Ligationsansatz gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Bakterien 90 Sekunden lang bei 42°C geschüttelt und sofort auf Eis gestellt. Die transformierten Zellen wurden dann mit 250-450 µl SOC-Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glukose) versetzt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt (200 U/min). Zur Aussonderung von nicht-transformierten Zellen, wurde die Bakteriensuspension auf Selektivagarplatten (1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium\* mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen, getrocknet und über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert. Bakterien mit rekombinanter DNA wurden durch Restriktionsanalyse der präparierten Plasmid-DNA identifiziert.

\* LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl

### 2.2.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter humaner oder muriner Trip6 Sequenzen wurden die im Materialabschnitt 2.1.9 aufgelisteten Primer verwendet. Zum Teil enthalten diese Primer Sequenzen bestimmter Restriktionsschnittstellen, die für Subklonierungen der Amplifikate genutzt werden können. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, wobei 10-100 ng Plasmid-DNA, je 1 µM Primer, 1x Pfu-DNA-Polymerase-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mg/ml BSA, 0,1 % Triton X-100), je 10 mM dNTPs und 1,25 U Pfu-Polymerase verwendet wurden. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer-Cycler (Norwalk, USA) durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine 2-minütige Denaturierung der Matrize bei 95 °C. In den folgenden 35 Zyklen wurde die Matrize bei 95°C für 30 sek. denaturiert, die Primer bei 55°C für 30 sek. an die Matrize hybridisiert und durch die Polymerase bei 72°C für 2 min. verlängert. Zuletzt wurde ein weiterer 4-minütiger Elongationsschritt durchgeführt. Je nach Schmelztemperatur der entsprechenden Primer wurde die Hybridisierungstemperatur für die PCR angepasst. Entsprechend der Länge der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz wurde die Elongationszeit (2 min. / kb) eingestellt. Zur Analyse der PCR-Produkte wurde die Reaktion auf ein TAE-Agarosegel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und photographisch dokumentiert.

### 2.2.1.10 Zero Blunt TOPO PCR Klonierung (*Pool-Klonierungsverfahren*)

Unterschiedliche PCR-Amplifikate einer Reaktion wurden jeweils in einen pCR-Blunt-II-TOPO Vektor kloniert. Der pCR-Blunt-II-TOPO Vektor der Firma Invitrogen liegt als linearisierter Vektor vor, an dessen 3'-Enden *Vaccinia* virus DNA Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Diese Bindungen werden nukleophil durch die freien 5'-OH-Enden des PCR-Amplifikats angegriffen, wodurch ein PCR-Produkt in den Vektor inseriert. Je länger die Inkubationszeit der Ligation desto mehr unterschiedliche Amplifikate werden ligiert. Für die Reaktion wurden 4 µl des PCR-Amplifikats mit 1 µl Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl pCR-Blunt-II-TOPO Vektor (10ng/µl) gemischt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt. 2 µl der TOPO-Reaktion wurden dann zu einem Aliquot (50 µl) chemisch kompetenter One Shot *E. coli* Bakterien pipettiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 40 sek. bei 42°C. Zu den Bakterien wurden 250 µl SOC-Medium (2% Bakto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose, pH 7) zugegeben und der Ansatz im Inkubator für 45 min. bei 37°C geschüttelt. Um die transformierten Bakterien



zu selektionieren wurden sie auf LB-Kanamycin-Agarplatten (1% Bakto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10mM NaCl, 1,5% Agarose, 50µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.1.11 Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA**

Zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA wurde der QuickChange Site-Directed Mutagenese Kit der Firma Stratagene verwendet. Anhand dieser Methode können Substitutionen und Deletionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren durchgeführt werden. Die QuickChange site-directed Mutagenese wurde unter Verwendung der PfuTurbo® DNA Polymerase in einem Perkin-Elmer-Cycler durchgeführt. Hierfür wurde eine supercoiled doppelsträngige DNA (dsDNA) mit dem entsprechenden Konstrukt sowie zwei synthetische Oligonukleotid-Primer, welche die gewünschte(n) Mutation(en) trugen, eingesetzt. Die Primer waren jeweils zu einem Strang der Plasmid-DNA komplementär und wurden während der PCR durch die PfuTurbo DNA Polymerase verlängert. Die Verwendung mutierter Oligonukleotide während der PCR erzeugte mutierte DNA-Plasmide, die an der(n) mutierten Position(en) keine Basenpaarung mit dem Wildtyp Plasmidstrang eingehen konnten. Nach der PCR Reaktion wurden die Plasmide mit der Endonuklease Dpn I verdaut. Die DNA der meisten E. coli Stämme wird durch das Enzym dam methyliert und ist daher zugänglich für die Endonuklease Dpn I. Dpn I besitzt eine Substratspezifität für methylierte und hemimethylierte DNA (Zielsequenz 5'-Gm ATC-3'), wodurch nur der parentale Plasmidstrang verdaut wurde und so die mutierten Plasmidstränge selektioniert werden konnten. Der mutierte Vektor wurde dann zur Vermehrung in XL1-Blue superkompetente Bakterien transformiert. Die mutierten Oligonukleotide hatten eine Länge zwischen 25 und 45 Basen, wobei die Mutation etwa in der Mitte lag. Die Primer besaßen am 5' und 3'-Ende ein G oder C. Ihre Schmelztemperatur ( $T_m$ ) war gleich oder größer als 78°C. Der GC-Gehalt lag bei mindestens 40%. Für die Berechnung dieser Bedingungen wurde die Formel  $T_m = 81,5 + 0,41 * (\% \text{GC-Gehalt}) - 675 / \text{Basenanzahl} - \% \text{Mutationen}$  verwendet. Für die PCR wurden 2,5 Einheiten Pfu Turbo DNA Polymerase, 1X Reaktionspuffer (100 mM KCl, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1% TritonX-100, 1 mg/ml BSA), 10 ng Plasmid-DNA, jeweils 125 ng der mutierten Oligonukleotide und 1 µl dNTPs in einem Volumen von 50 µl aufgenommen. Zur Denaturierung der DNA wurde der Ansatz im Thermocycler bei 95°C für 30 sek. inkubiert, bevor er 20 Zyklen mit dem Programm 95°C für 30 sek., 55°C für 1 min. und 68°C für 20 min durchlief. Für den Verdau des Parentalkonstrukts wurden 10 Einheiten Dpn I zu dem PCR-Ansatz pipettiert und bei 37°C

für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 1 µl des Verdauungsprodukts zu 50 µl XL-Blue superkompetente Bakterien pipettiert, für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 40 sek. bei 42°C durchgeführt und nach Zugabe von 950 µl LB-Medium für 45 min. bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-LB-Agarselektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung der in die Plasmid-DNA eingeführten Mutation(en) wurde die DNA sequenziert.

#### **2.2.1.12 Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA**

Zur Isolierung kleiner Plasmid-DNA Mengen wurden Bakterienkolonien in 2 ml LB-Medium (1% Bakto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, pH 7) mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 µg/ml) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. 1 ml der Kultur wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Für die Lyse des Bakterien-Pellets wurde es in 200 µl TELT\* plus 20 µl Lysozym\* resuspendiert, für 3 min. bei 95 °C inkubiert und direkt anschließend für 5 min. auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert und mit einer Pipettenspitze aus dem Überstand entfernt. Zur Präzipitation der DNA aus dem Überstand wurden 100 µl Isopropanol zugegeben, gevortext und bei 12000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

\*TELt: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4% Triton X-100

\*Lysozym: 10 mg/ml in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0)

#### **2.2.1.13 Präparation von großen Mengen rekombinanter Plasmid-DNA**

Zur Isolierung größerer Plasmid-DNA Mengen wurden Bakterien in 250 ml LB-Medium (1% Bakto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, pH 7) mit dem entsprechenden Antibiotikum (50 µg/ml) über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mittels dem Qiagen-Plasmid-Maxi-Kit nach dem Protokoll der Firma Qiagen gewonnen. Dazu wurde eine Bakterienkultur bei 6000 rpm für 15 min. pelletiert, in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mg/ml RNaseA) resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 (0,2M NaOH; 1% SDS) bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M Kaliumacetat) wurde das Bakterienlysat neutralisiert und bei 4°C mit 9000 rpm für 15 min. zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf eine Ionenaustauschsäule gegeben, die zuvor mit Puffer QBT (750 mM

NaCl, 50 mM MOPS; 15% Ethanol, pH 7, 0,1% Triton X-100) äquillibriert worden war. Die an der Säulenmatrix adsorbierte Plasmid-DNA wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS; 15% Ethanol, pH 7) gewaschen und mit 12 ml Puffer QF eluiert. Nach Isopropanolfällung und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für max. 10 min. getrocknet und in 250 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen.

#### **2.2.1.14 Radioaktive Markierung von DNA**

Zur radioaktiven Markierung von DNA (Proben) wurde der *Rediprime Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) eingesetzt. Die dort angewandte Methode (nach Feinberg und Vogelstein, 1983) beruht auf einer Anlagerung von Hexanukleotidprimern aller statistisch möglichen Nukleotid-Sequenzen an die Einzelstränge der zu markierenden DNA. Dabei wird der komplementäre Strang ausgehend von den 3'-Enden der *random* (Zufalls) Oligonukleotide mit Hilfe der DNA Polymerase I, dem Klenow-Enzym, synthetisiert. Auf diese Weise werden die als Substrat angebotenen <sup>32</sup>P-markierten Deoxynukleosidtriphosphate in den entstehenden komplementären Strang eingebaut. Der *Rediprime Kit* wurde den Anweisungen des Herstellers entsprechend angewandt. Hierbei wurden 20-100 ng DNA (Probe) in 45 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in ein *Rediprime*-Reaktionsröhrchen gegeben, welches ein Lyophilisat aus den *random*-Hexanukleotiden, DNA Polymerase I, dNTPs und Reaktionspuffer enthält. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (300 Ci/mM, 10 mCi/ml; Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) und 10 Minuten Inkubation bei 37°C. Die Reinigung des markierten DNA-Fragments von nicht-inkorporierten Nukleotiden erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex-G-50 DNA Säule (*NICK Column*) der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, wobei freie Radionuklide an der Säulenmatrix assoziieren, während die markierte DNA mit 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) eluiert wurde. Bevor das radioaktiv markierte Fragment als Probe für die DNA- oder RNA-Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde die Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers (Kontron Analytical, Schweiz) bestimmt.

#### 2.2.1.15 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Die embryonale Stammzellen wurden nach Erreichen eines konfluenten Wachstums in 0,1% gelatinisierten 96-Well-Platten einmal mit PBS gewaschen und dann mit jeweils 50 µl DNA-Lysis-Puffer\* per Well über Nacht lysiert. Zu jedem Well wurde dann eiskalter Ethanol zugegeben und die 96-Well-Platte bei RT geschüttelt bis die genomische DNA sichtbar wurde. Die genomische DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 15 min. an den Boden der 96-Well-Platte fixiert. Danach wurde die DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Je nach der gewünschten folgenden Analyse wurde mit der DNA entsprechend weiterverfahren. Für die PCR-Analyse wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Für die Southern-Blot-Analyse wurde die DNA in 50 µl der entsprechenden Restriktionsenzym-Lösung gelöst und über Nacht verdaut.

\*DNA-Lysis-Puffer: 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine, Sigma) und 1 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)

#### 2.2.1.16 Southern Blot

Die aus den ES-Zellen gewonnene genomische DNA wurde nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem 0,8% TAE-Agarose-Gel durch Anlegen von 100 V Spannung für 2-3 h elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Das Agarose-Gel wurde dann mit 0,25 M HCl für 20 min. depurinisiert und anschließend mit dem Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) für 30 min. denaturiert. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (*Hybond N+ nylon membrane*, Amersham, Braunschweig) wurde nach dem Verfahren des Kapillartransfers (Löschpapier-Prinzip) durchgeführt und erfolgte über Nacht unter Einsatz von 10x SSC-Puffers\*. Die Membran wurde dann für 10 min. in 50 mM NaPi\* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , auf pH 7,2 mit konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bringen) gelegt und dann für weitere 10 min. in frischem 50 mM NaPi leicht geschüttelt. Die Membran wurde dann für 1 h bei 80 °C getrocknet und die DNA auf der Membran UV-fixiert (mit Hilfe des *UV Stratalinkers 2400* von Stratagene, La Jolla, USA) und unter langwelligem UV-Licht (254 nm) kontrolliert.

\* 20x SSC-Stammlösung: 3 M NaCl, 300 mM Natriumzitat pH 7,0

\* 1M NaPi-Stammlösung: 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , auf pH 7,2 mit konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bringen

### **2.2.1.17      *Southern Blot* Hybridisierung**

Für die Hybridisierung der markierten Probe mit der immobilisierten DNA wurde Church-Puffer (0,5 M NaPi\*, 7% (w/v) SDS, 1mM EDTA, pH 8) verwendet. Die Membran wurde zunächst für 1 h bei 65°C unter ständigem Rotieren mit dem Church-Puffer prä-hybridisiert. Die radioaktivmarkierte DNA-Probe mit einer Aktivität von mindestens  $1,5 \times 10^6$  cpm/ml wurde für 5 min. bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Unmittelbar danach wurde die DNA-Probe zur prä-hybridisierten Membran im Church-Puffer zugegeben und über Nacht bei 65 °C unter ständigem rotieren inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit jeweils frischem Wasch-Puffer (40mM NaPi\*, 1% (w/v) SDS) zweimal für 5 min. bei 55 °C, dann 15 min. bei 65 °C und zum Schluss für weitere 30 min. bei 65 °C unter ständigem rotieren gewaschen. Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen.

\* 1M NaPi-Stammlösung: 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O, auf pH 7,2 mit konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bringen

### **2.2.1.18      Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen**

Adhärent wachsende Zellen wurden unter entsprechenden Bedingungen bis zum Erreichen von 80%iger Konfluenz kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1 ml *peqGOLD TriFast* Lysispuffer (Peqlab, Erlangen) pro 75 cm<sup>2</sup> Schale lysiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (200 µl pro ml Lysispuffer) wurde gründlich gemischt (15 Sekunden) und 10 Minuten bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 12 000 U/min führte zur Phasentrennung. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt, mit Isopropanol (500 µl pro ml Lysispuffer) vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Das RNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000 U/min und 4°C sedimentiert, zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in deionisiertem Wasser gelöst. Nach Messung der RNA-Konzentration wurde die RNA-Lösung bei –80°C gelagert.

#### **2.2.1.19 cDNA-Synthese und RT-PCR**

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 14 µl mit 250 ng Random Oligonukleotidprimern für 5 min bei 70°C und anschließend für 1 min bei 4°C inkubiert. Die Transkription erfolgte in Anwesenheit von 0,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs), 200 U Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase (M-MLV-RT) und 5 µl 5x Reaktionspuffer in einem Volumen von 25 µl. Zum Nachweis von Rückständen genomischer DNA wurde die gleiche Reaktion in einem 12,5 µl Volumen ohne M-MLV-RT angesetzt („minus RT-Kontrolle“). Beide Ansätze wurden zunächst für 10 min bei 20°C und anschließend für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Enzym-Inaktivierung wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C erreicht. Nach 5 min bei 4°C wurden 75 µl Wasser zugegeben. Die cDNA wurde dann in einer anschließenden Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert (Zweitstrang-Synthese).

#### **2.2.1.20 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Gesamt-RNA wurde 1 g Agarose (Peqlab, Erlangen) in 100 ml MOPS-Puffer (20 mM 4-Morpholinpropansulfonsäure, 5 mM Natriumazetat, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,0) gelöst und autoklaviert. Das Gel wurde durch Erhitzen verflüssigt und mit 3 ml 37 % Formaldehyd-Lösung versehen, in eine RNase-freie Gelelektrophorese-Kammer gegossen und nach dem Polymerisieren mit MOPS-Puffer beschichtet. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurde die RNA mit RNA-Probenpuffer (MOPS, 22,6% Formaldehyd, 64,5% Formamid, 3 mg/ml Ethidiumbromid) versetzt und für 15 Minuten bei 56°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte über 3 Stunden bei 90 V. Unter langwelligem UV-Licht wurde die ribosomale RNA sichtbar gemacht und photographiert. Auf diese Weise können Unterschiede bezüglich der eingesetzten RNA-Extraktmenge festgestellt werden.

#### **2.2.1.21 Northern Blot**

Der Transfer von RNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond N+ nylon membrane, Amersham, Braunschweig) wurde nach dem Verfahren des Kapillar-Transfers (Löschpapier-Prinzip) durchgeführt und erfolgte über Nacht unter Einsatz eines 10x SSC-Puffers (1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat pH 7,0). Vor der weiteren Verwendung der Membran wurde die RNA auf der Membran UV-fixiert (mit Hilfe des UV Stratalinkers 2400 von Stratagene, La Jolla, USA) und unter langwelligem UV-Licht kontrolliert.

#### **2.2.1.22 Northern Blot Hybridisierung**

Für die Hybridisierung der markierten Sonde und der immobilisierten RNA wurde die Hybridisierungslösung (Quik-Hyb) der Firma Stratagene, Heidelberg verwendet. Den Anweisungen des Herstellers entsprechend wurde die Membran für 20 Minuten bei 68°C unter ständigem Rotieren prä-hybridisiert. Währenddessen wurde die radioaktivmarkierte DNA-Probe in einer Menge, welche einer Aktivität von mindestens  $1,2 \times 10^6$  cpm/ml entspricht, mit 10 mg sonifizierter Heringsspermien-DNA (Stratagene, Heidelberg) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Unmittelbar danach wurde die Probe zur Hybridisierungslösung zugegeben und für eine Stunde bei 68°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Im Anschluss an den Hybridisierungsvorgang wurde die Membran zweimal mit 150 ml 2x SSC\*/0,1% SDS-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur und einmal in 150 ml 0,5x SSC\*/0,1% SDS-Puffer für 30 Minuten bei 60°C unter rotieren gewaschen und in eine Frischhaltefolie eingeschlagen.

\* 20x SSC-Stammlösung: 3 M NaCl, 300 mM Natriumzitat pH 7,0

#### **2.2.1.23 Detektion von radioaktiven Signalen**

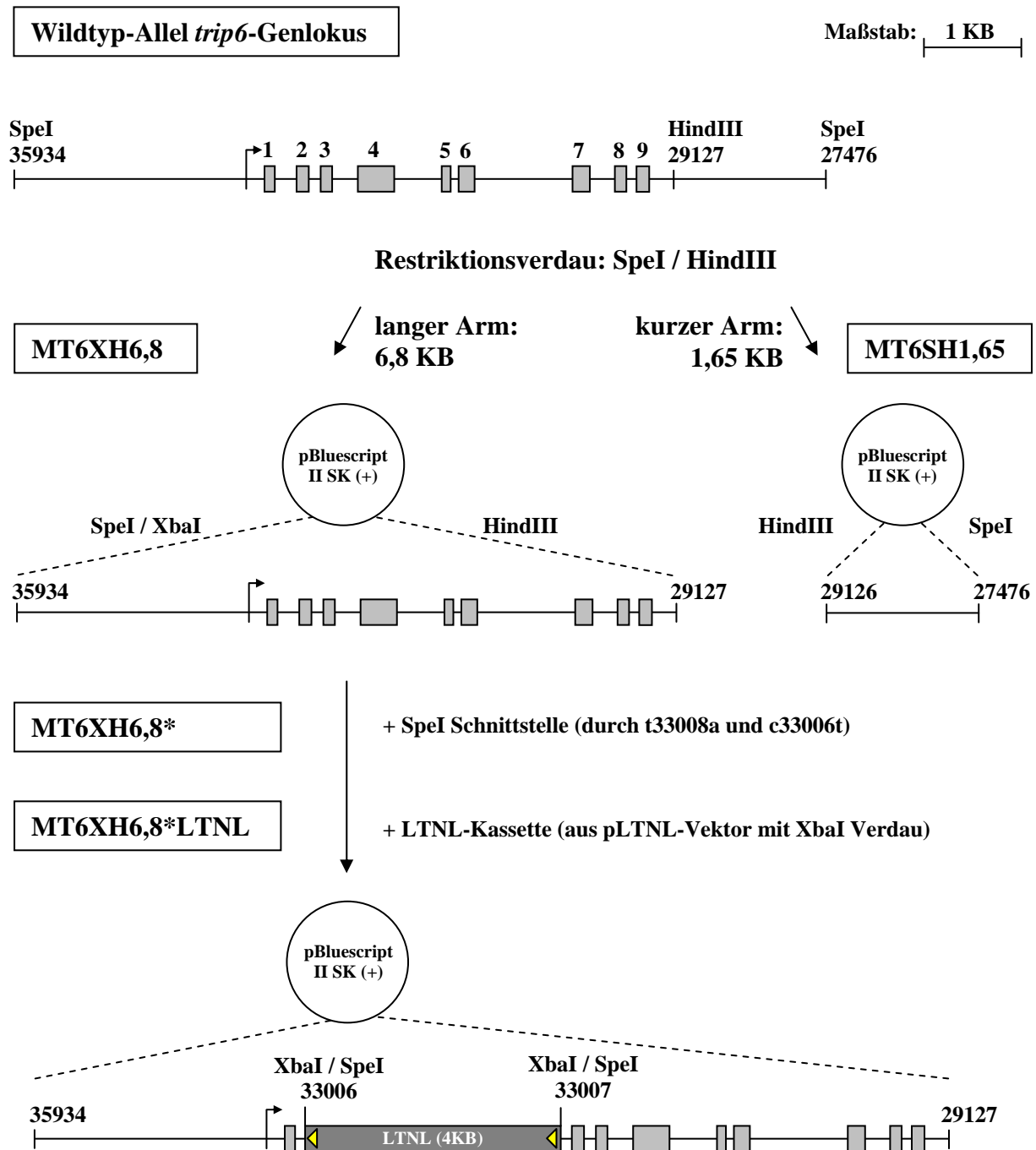
Die in Frischhaltefolie eingeschlagenen Southern-Blot und Northern-Blot Membran wurde entweder gegen einen Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm XP; Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) exponiert, welcher danach entwickelt wurde oder mit einem Phosphorimager Screen (Fujifilm, Japan) bedeckt, der mit Hilfe der AIDA 200.1 Software /Raytest GmbH, Straubenhardt) analysiert wurde.

### **2.2.2 Klonierung des pTVFlox-*trip6* targeting Vektors**

Die Klonierung des *trip6-targeting*-Vektors erfolgte durch Anwendung der im Kapitel 2.2.1 beschriebenen Nukleinsäure-Methoden. Das Kosmid #14 wurde mit SpeI und HindIII verdaut und die 6,8 und 1,65 KB Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert. Anschließend wurden die Fragmente in pBluescript-Vektoren ligiert die entsprechend ihrer Insertgrößen die Namen MT6XH6,8 und MT6XH1,65 erhielten. In den MT6XH6,8 Vektor wurde durch Punktmutation der *trip6*-Nukleotide t33008a und c33006t eine SpeI-Schnittstelle. Daraus resultierte das Konstrukt MT6XH6,8\*. Danach wurde eine mit XbaI-Schnittstellen flankierte LTNL-Kassette (loxP/Thymidin-Kinase/Neomycin/loxP) aus dem pLTNL-Vektor ausgeschnitten und in den SpeI-linearisierten MT6XH6,8\* ligiert (MT6XH6,8\*LTNL). Diese Arbeitsschritte sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

Für die folgenden Schritte wurde der MT6XH6,8\*LTNL als Matrize für die erste PCR-Reaktionen mit den Primern mT6\_35934\_NheI und mT6\_33006\_AscI und für eine zweite PCR-Reaktion mit den Primern mT6\_33013\_AscI und mT6\_29127\_SalI verwendet. Die daraus resultierenden Amplifikate, MT6NA2,92 und MT6AS3,88, wurden jeweils in pCR-Blunt II-TOPO Vektoren anhand der Zero Blunt TOPO PCR Klonierung in Abschnitt 2.2.1.10 ligiert. Zuerst wurde das MT6AS3,88 Fragment aus dem pCR-Blunt II-TOPO Vektor anhand eines SalI/AscI-Restriktionsverdaus ausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den pTVFlox-0 Basisvektor ligiert. Danach wurde das MT6NA2,92 Fragment aus dem pCR-Blunt II-TOPO Vektor anhand eines AscI/NheI-Restriktionsverdaus ausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den pTVFlox-MT6AS3,88 ligiert. Zuletzt wurde das MT6SH1,65 Fragment anhand eines XhoI/SpeI-Restriktionsverdaus aus dem pBluescript-Vektor ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den pTVFlox-MT6AS3,88-MT6SH1,65 ligiert. Daraus resultierte der *trip6*-targeting-Vektor. Diese Arbeitsschritte sind detailliert in Abbildung 7 dargestellt.





**Abb. 6: Klonierung des langen und kurzen homologen *targeting*-Arms**

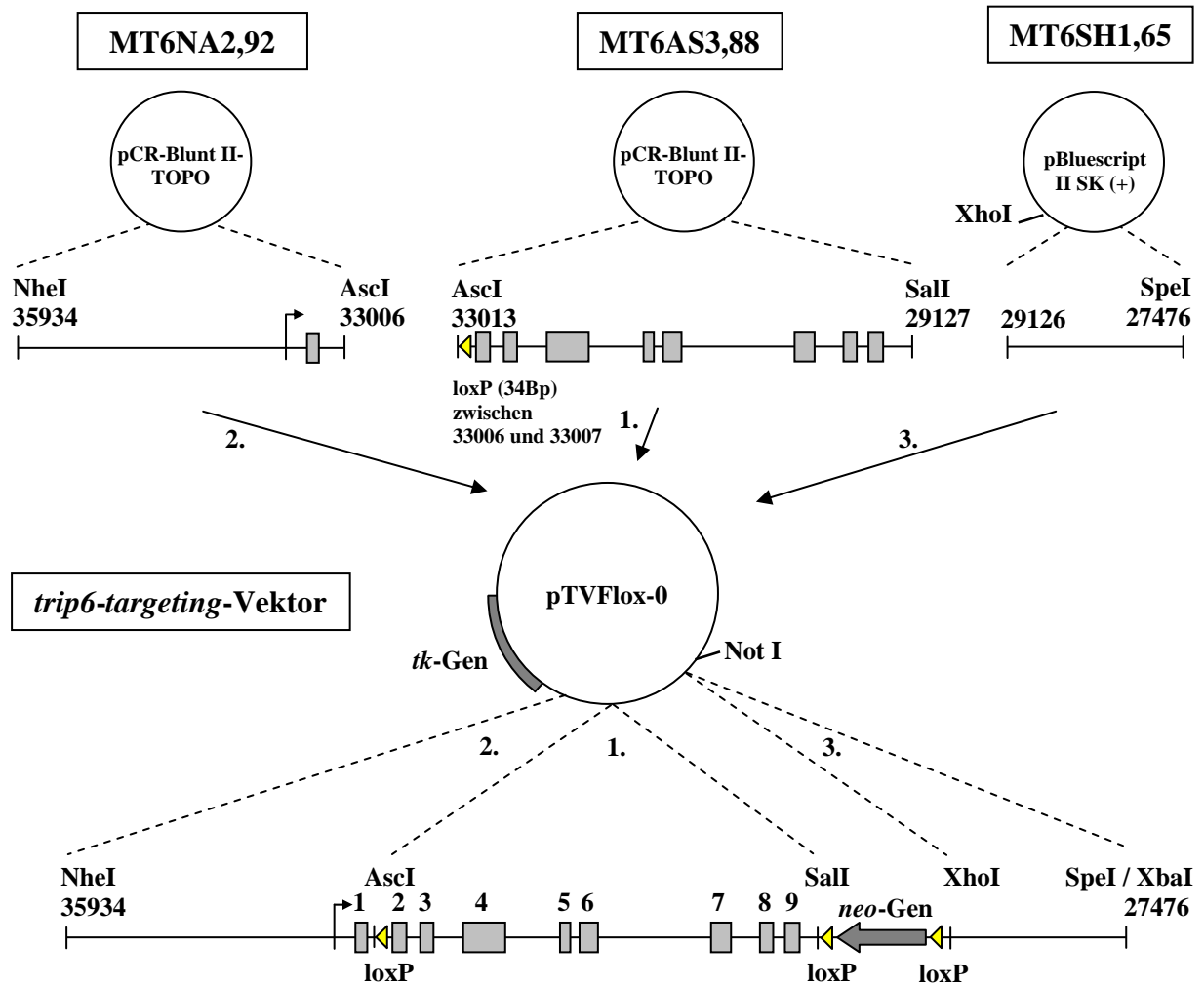
Das Kosmid #14, das den *trip6*-Lokus enthält wurde mit *SpeI* und *HindIII* verdaut, die 6,8 und 1,65 KB Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert und in pBluescript-Vektoren (MT6XH6,8 und MT6XH1,65) ligiert. Die Ligationen sind durch gestrichelte Linien dargestellt, wobei die Beschriftungen die für die Ligation verwendeten Schnittstellen angeben. In den MT6XH6,8 wurde durch Punktmutation der Nukleotide t33008a und c33006t eine *SpeI*-Schnittstelle in das Intron eins eingeführt (MT6XH6,8\*). Danach wurde eine mit *XbaI*-Schnittstellen flankierte LTNL-Kassette (loxP/Thymidin-Kinase/Neomycin/loxP) aus dem pLTNL-Vektor ausgeschnitten und in den *SpeI*-linearisierten MT6XH6,8\* ligiert (MT6XH6,8\*LTNL). Diese Klonierungen wurde von Frau Dr. Irene Huber durchgeführt.

**PCR-Reaktion mit MT6XH6,8\*LTNL als Matrize**

**PCR-Produkte**

**Primer zur Einführung von geeigneten Restriktionsschnittstellen:**

mT6_35934_NheI:	ccag GCTAGC tgagaaatgtcttacagctggatccc	}	MT6NA2,92
mT6_33006_AscI:	gg GCGCGGCC gtacctcggtagagct		
mT6_33013_AscI:	cca GCGCGGCC ataactcgtataatgtatgctatacc	}	MT6AS3,88
mT6_29127_SalI:	gg GTCGAC aagcttcaccagcctcatcctgtgag		



**Abb. 7: Klonierung des *trip6*-targeting-Vektors**

Der MT6XH6,8\*LTNL diente als Matrize für die Amplifikation der Sequenzen MT6NA2,92 und MT6AS3,88. Sie wurden jeweils in pCR-Blunt II-TOPO Vektoren ligiert. Die einzelnen Sequenzen wurden in drei Schritten in den pTVFlox-0 Basisvektor ligiert: (1) MT6AS3,88 anhand der SalI/AscI Schnittstellen, (2) MT6NA2,92 über die Schnittstellen AscI/NheI und (3) MT6SH1,65 durch die Schnittstellen XhoI/SpeI.

## **2.2.3 Protein-Methoden**

### **2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Zur Herstellung der Proteineichkurve wurden jeweils zu 1 ml Bradford-Reagenz (5 % EtOH, 10 % Phosphorsäure, 10 % Coomassie Brilliant-Blue G250) 2, 4, 6 und 8 µg BSA (1 mg/ml) gegeben und gevortext. Von der Lösung mit der unbekannten Proteinkonzentration wurden 2 µl auf 1 ml Bradford-Reagenz gegeben und gevortext. Aus jedem Ansatz wurden 200 µl in jeweils ein Loch einer Mikrotiter-Platte pipettiert und die Extinktion bei  $\lambda=595\text{nm}$  in einem ELISA-Lesegerät spektralphotometrisch gemessen. Durch Berechnung der Proteineichkurven-Steigung ( $m = \text{Extinktion [BSA]} / \text{Konzentration [BSA]}$ ), kann die unbekannte Proteinkonzentration einer Lösung anhand deren Extinktionswert bestimmt werden ( $\text{Konzentration [Protein]} = m \times \text{Extinktion [Protein]}$ ).

### **2.2.3.2 Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese analysiert. Alle Polyacrylamidgele bestanden aus einem 10% Trenngel und einem 5% Sammelgel. Für die Herstellung des Trenngels wurden 10% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30/0,8), 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,05 % TEMED gemischt. Die Trenngellösung wurde zwischen zwei Mini-Glasplatten, die durch einen 0,75 mm starken Abstandshalter getrennt und in einer vertikalen Apparatur (Mighty Small, Höfer) eingespannt waren, bis ca. 3 cm unter der Oberkante Glasplatte pipettiert. Die Trenngellösung wurde dann sofort mit Isopropanol überschichtet, um sie vom Luftsauerstoff abzutrennen und eine gerade Ebene zu erhalten. Nachdem die Trenngellösung polymerisiert war, wurde der Isopropanol entfernt und die Sammelgellösung (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 5 % Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8), 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) zwischen die Glasplatten auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm zur Aussparung der Taschen eingesetzt. Das fertige Polyacrylamidgel wurde dann in eine vertikale Elektrophorese-Kammer (Mighty Small, Höfer) eingespannt und diese mit 1 x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) aufgefüllt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein geeigneter Protein-Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V bis die Bromphenolblau-Front aus dem Gel lief.

### 2.2.3.3 Western-Blot und immunchemische Detektion von Proteinen

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer horizontalen semi-dry-Blot-Apparatur (semi-dry, Harnischmacher, Kassel) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen jeweils 3 Lagen mit Transfer-Puffer\* getränktem 3MM Papier in die Blot-Apparatur gelegt. Der Transfer wurde für 2 h bei konstanter Stromstärke mit  $1 \text{ mA/cm}^2$  der PVDF-Membran durchgeführt. Danach wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min. in TBST\* mit 5% fettfreier Milchpulver geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung entsprechend der Herstellerangaben) in TBST\* mit 5% fettfreier Milchpulver immunhybridisiert. Die Membran wurde dann dreimal für 5 min. mit TBST\* gewaschen und anschließend 30 min. mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung entsprechend der Herstellerangaben) in TBST\* mit 5% fettfreier Milchpulver immunhybridisiert. Danach wurde die Membran erneut mit dreimal für 5 min. mit TBST\* gewaschen. Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Hierfür wurde zunächst die Membran kurz in 1X PBS geschwenkt und dann auf eine Folie gelegt. Die ECL Western-Blot Nachweisreagenzien 1 und 2 (Amersham, Freiburg) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert und bei Raumtemperatur für 2 min. inkubiert. Die ECL-Lösung wurde entfernt, die Membran in Folie eingeschlagen und in der Dunkelkammer gegen einen Hyper-ECL-Röntgenfilm exponiert.

\* Transferpuffer: 20 mM Tris, 192 mM Glyzin, 10% Methanol

\* TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

\* TBST: TBS, 0,05 % Tween 20

### 2.2.3.4 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten

Für die Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten wurden  $2 \times 10^7$  Zellen verwendet. Adhärenente Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, vorsichtig mit einem Gummischaber in 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem PBS abgelöst und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 2 min bei 1000 rpm pelletiert. Die Hälfte des Pellets wurde in 100  $\mu\text{l}$  Lysispuffer\* mit 1x PAGE-Ladepuffer\* resuspendiert, sonifiziert und als Gesamtzellextrakt verwendet. Die andere Hälfte des Pellets wurde für 3 min. in 100  $\mu\text{l}$  Lysispuffer\* auf Eis lysiert und danach sofort für 5 min. bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand (zytosolischer Extrakt) wurde abgenommen und sofort mit 1x Ladepuffer\* vermischt. Die pelletierten Kerne wurden einmal in Wasch-

Puffer gewaschen, in 100 µl Lysispuffer\* mit 1x Ladepuffer\* resuspendiert, und sonifiziert. Die Extrakte wurden anschließend in die SDS-PAGE und Western-Blot-Methode analysiert.

\* Lysispuffer: 25 mM HEPES-KOH pH 7,9, 50 mM NaCl, 1,5 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 1 mM PMSF, PIC

\* 2x PAGE-Ladepuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoethanol, Bromphenolblau

### 2.2.3.5 *In vitro* Translation

Zur Untersuchung der Translationsinitiation an der Trip6 mRNA wurden die entsprechenden Trip6-Konstrukte zusammen mit Kontroll- oder Trip6-Morpholinos *in vitro* transkribiert und die synthetisierte Trip6 mRNA *in vitro* translatiert. Beide Reaktionen wurden in einem Schritt mit Hilfe des TNT-gekoppelten Retikulozytenlysatsystem (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte für 60 min. bei 30 °C in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

25 µl TNT Retikulozytenlysatsystem aus dem Kaninchen

2 µl TNT Reaktionspuffer

1 µl TNT RNA Polymerase T7

1 µl Aminosäuren-Lösung mit Methionin 1mM

1 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor (40U/µl)

1 µg Plasmid-DNA

5 µM Morpholinos

mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl bringen

### 2.2.3.6 Luziferase-Reportergen-Analyse

NIH-3T3/Klon#24c Zellen wurden nach entsprechender Transfektion mit Kontroll- oder Trip6-Morpholinos (jeweils 40 µM) und 16-stündiger Behandlung mit DMSO oder TPA (50 ng/ml), 2 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 50 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) resuspendiert. Nach 15 min. auf Eis wurde das Lysat gemessen. Die Bestimmung der *Photinus*-Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Luminometers (ELX808; Bio-Tek Instruments), wobei 20 µl Lysat mit 70 µl Reaktionspuffer (25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, pH 7,8 mit 1 mM DTT und 2 mM ATP) und 30 µl D-(-)-Luziferin-Lösung (0,28 mg/ml 0,5 M Tris, pH 7,5) gemischt und sofort gemessen wurden. Die bei der Luziferin-Oxidation freiwerdende Lumineszenz wurde gemessen und alle Daten wurden mit dem Wert von Kontroll-Morpholino transfizierten, DMSO-behandelten Zellen normalisiert.

### 2.2.3.7 Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die Immunfluoreszenz wurden transient transfizierte Cos-7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden vor der Transfektion auf sterilen runden Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 min. bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Danach wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 5 min. permeabilisiert und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 1 % BSA in PBS für 30 min. blockiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben in PBS mit 1% BSA verdünnt, je 20 µl auf die Deckgläschen pipettiert und in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 20 µl der fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 in PBS mit 1 % BSA) auf die Deckgläschen pipettiert und in einer dunklen feuchten Kammer für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und die Kerne mit 1 µg/µl DAPI in PBS für 1 min. bei RT gefärbt. Die Deckgläschen wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und dann mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen Einbetttharz (DAKO, Fluoreszenz *Mounting* Medium) gelegt. Bis zur Betrachtung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben im Dunklen bei +4 °C aufbewahrt.

10% Paraformaldehyd: Unter dem Abzug wurden 20 g Paraformaldehyd in 100 ml H<sub>2</sub>O bei 60 °C unter ständigem rühren gelöst. Um das Paraformaldehyd zu depolymerisieren und daher besser zu lösen wurden einige Tropfen 1 M NaOH zugegeben. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung gefiltert und mit 100 ml 2x PBS aufgefüllt. Die Paraformaldehyd-Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2x PBS: 274 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## **2.2.4 Zellkulturmethoden**

### **2.2.4.1 Transformierte Säugetierzelllinien**

#### **2.2.4.1.1 Kulturbedingungen**

Die Arbeiten an Säugetierzellen erfolgte im Zellkulturlabor unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sterilbank der Firma Glatt, Schweiz. Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einem Inkubator der Firma Heraeus bei 6 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit. Alle Zellen wurden in Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) mit 100 U/ml Streptomycin/Penicillin der Firma Gibco BRL kultiviert. Das Kulturmedium DMEM für die HeLa- Zelllinie erhielt zusätzlich 10% FCS, die NIH 3T3-Zelllinie einschließlich des Klons #24c erhielten zusätzlich 10% DCS. Zum Erhalt der stabilen Transfektion der NIH-3T3 #24c Zelllinie wurde zum Kulturmedium zusätzlich Blasticidin (10µg/ml) zugegeben.

#### **2.2.4.1.2 Passagieren von Zellen**

HeLa Zellkulturen wurden nach Erreichen von 90% Konfluenz, Cos-7 und NIH-3T3 Zellkulturen nach Erreichen von 70% Konfluenz 1:5 verdünnt und in neue Zellkulturschalen überführt. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1X PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin bei 37°C für 2 min. im Inkubator vom Boden der Zellkulturplatte gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde entsprechendes Zellkulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm für 2 min. pelletiert und nach entsprechender Verdünnung in frischem Kulturmedium in neue Zellkulturschalen überführt.

#### **2.2.4.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl Zellsuspension 1:5 mit 1X PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

#### **2.2.4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zellen ( $1\text{-}5 \times 10^7$  Zellen/ml) wurden sie nach dem Trypsinieren und Pelletieren in 1 ml Einfriermedium (DMEM, 40% FCS und 10% DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen transferiert und sofort auf Eis gestellt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Röhrchen in Zellstoffpapier eingeschlagen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen nach maximal einer Woche in flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden sie sofort nach dem Herausnehmen aus dem flüssigen Stickstoff in ein Wasserbad mit  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestellt. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen bei 1000 rpm für 2 min. pelletiert in 15 ml Medium resuspendiert und in geeignete Zellkulturschalen ( $175\text{ cm}^2$ ) ausgesät.

#### **2.2.4.1.5 Plasmid-DNA Transfektion mittels Lipofectamine 2000**

Pro Well einer 6-Well-Platte wurden  $2 \times 10^6$  HeLa Zellen ausgesät und 24 h später entsprechend den Herstellerangaben (Invitrogen) mit jeweils  $4\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA anhand der Lipofectamine 2000 Methode transfiziert. Hierfür wurden pro Ansatz  $250\text{ }\mu\text{l}$  DNA-Lsg. ( $250\text{ }\mu\text{l}$  DMEM,  $4\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA) und  $250\text{ }\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz-Lsg. ( $250\text{ }\mu\text{l}$  DMEM,  $12\text{ }\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000) getrennt voneinander hergestellt und für 5 min. bei RT inkubiert. Danach wurden DNA- und Transfektionsreagenz-Lsg. vermischt und für 15 min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und pro Ansatz 2 ml Kulturmedium (DMEM, 10% DCS) zu den Zellen gegeben. Die DNA-Transfektionsreagenz-Lsg. wurde dann zu den Zellen pipettiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren 24 h die Western-Blot-Analyse geerntet. Mit Cos-7 Zellen wurde ähnlich verfahren.  $1 \times 10^6$  Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und jeweils mit  $2\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und  $6\text{ }\mu\text{l}$  Lipofectamine transfiziert und nach 48 h für die Immunfluoreszenz-Analyse geerntet.

#### **2.2.4.1.6 siRNA Transfektion mittels Lipofectamine 2000 in NIH-3T3**

Für die Reduzierung endogener mRNA Mengen wurden  $7,5 \times 10^4$  3T3 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät und nach 24 h mittels Lipofectamine 2000 nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen) mit siRNA transfiziert. Hierfür wurden pro Ansatz  $50\text{ }\mu\text{l}$  siRNA-Lsg. ( $50\text{ }\mu\text{l}$  DMEM,  $20\text{ pmol}$  siRNA) und  $50\text{ }\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz-Lsg. ( $50\text{ }\mu\text{l}$  DMEM,  $3\text{ }\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000) getrennt voneinander hergestellt. Die weitere Transfektion erfolgte wie in 2.2.4.1.5 beschrieben. Die Analyse der Protein-Expression erfolgte durch Western-Blot.



#### **2.2.4.1.7 Morpholino Transfektion mittels Endoporteur in NIH-3T3**

Pro Well einer 24-Well-Platte wurden  $7,5 \times 10^4$  NIH-3T3 Zellen ausgesät und nach 24 h mittels Endoporteur nach Angaben des Herstellers (Gene-Tools) mit Morpholinos transfiziert. Vor der Transfektion wurden die Morpholinos für 5 min. bei 65 °C im Heizblock aufgetaut und dadurch auch vollständig gelöst. Das Kulturmedium der Zellen wurde gegen 250 µl frisches Medium (DMEM, 10% DCS) getauscht und jeweils 1,5 µl Endoporteur und 40 µM Morpholinos zum Medium pipettiert. Nach 48 h wurden die Zellen zur Analyse der Proteinexpression anhand des Western-Blot-Verfahrens geerntet.

#### **2.2.4.1.8 TPA-Behandlung von NIH-3T3 nach Morpholino Transfektion**

Jeweils  $7,5 \times 10^4$  NIH-3T3 Klon #24c Zellen wurden wie in 2.2.4.1.7 beschrieben mit Morpholinos transfiziert. Die Transfektion erfolgte jedoch mit Medium ohne Serum. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit 50 ng/ml TPA oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO für 16 Stunden behandelt. Danach wurden die Zellen für die Luziferaseaktivitäts-Messung geerntet.

#### **2.2.4.2 Embryonale-Stammzelllinien**

##### **2.2.4.2.1 Kulturbedingungen**

Alle embryonalen Stammzellkulturarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 an einer Sicherheitswerkbank (Klasse II; Thermo Elektron, Dreieich) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5-6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Labotec, Göttingen). Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) HM-1 wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen der Firma Corning kultiviert, die zuvor mit 0,1% Gelatine in 1x PBS für 5 min. bei Raumtemperatur beschichtet worden waren. Die E14.1 ES-Zellen wurden in nicht-gelatinisierten 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen der Firma Corning auf murinen embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen,  $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) kultiviert. Die Feeder-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Kathrin Eberhardt (FLI, Jena) aus 13,5 Tage alten Embryonen der Mauslinie C57BL/6J *tk/neo* präpariert und kultiviert. Alle weiteren Manipulationen wurden bei beiden ES-Zelllinien nach denselben Methoden durchgeführt. Das Medium der ES-Zellen (15% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol, 500 µl LIF, in DMEM (Sigma)) wurde jeden Tag gewechselt. Die ES-Zellen wurde nach Erreichen von ca. 50% konfluenten Wachstum wie in 2.2.4.1.2

beschrieben passagiert. Das Einfrieren der ES-Zellen erfolgte in Einfriermedium (90% FCS (Cambrex), 10% DMSO) nach dem gleichen Prinzip wie in 2.2.4.1.4 beschrieben.

#### **2.2.4.2.2 Elektroporation embryonaler Stammzellen**

Die ES-Zellen wurden 24 h vor der Elektroporation passagiert, um sie in einer logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Am nächsten Tag wurden zunächst  $1 \times 10^6$  ES-Zellen in 800  $\mu$ l 1x PBS ohne Kalzium und Magnesium resuspendiert. Danach wurden 20  $\mu$ g des linearisierten *trip6-targeting*-Vektors in eine 4 mm Elektroporationsküvette (peqLab, Erlangen) pipettiert. Anschließend wurden die ES-Zellen in die Küvette gegeben und mit der DNA vorsichtig vermischt. Die Küvette wurde dann in ein Elektroporationsgerät der Firma Biorad (GenePulser) gestellt und die ES-Zellen mit 260 V und 500  $\mu$ F für 3 bis 6 Millisekunden elektroporiert. Die ES-Zellen wurde dann für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine entsprechend vorbehandelte 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale ausgesät. 24 h nach der Elektroporation mit dem *trip6-targeting*-Vektor wurden die ES-Zellen für 5 bis 7 Tage mit 0,3 mg/ml G418 (Gibco, Karlsruhe) selektioniert. Die resistenten ES-Zellklone wurden unter einem Binokular gepickt, trypsiniert und jeweils zur Hälfte in zwei 96-Well-Platte überführt. Eine 96-Well-Plate wurde weiter kultiviert, während die andere Platte zur Extraktion der genomischen DNA verwendet wurde (siehe 2.2.1.15). Danach erfolgte die Analyse der homologen Rekombination mittels *Southern* Blot (siehe 2.2.1.16).

Für die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des *neo*-Gens in ES-Zellen die mit dem *trip6-targeting*-Vektor homolog rekombiniert worden waren, wurde anhand der oben beschriebenen Methode 10  $\mu$ g pMC-Cre Plasmid elektroporiert. Nach 48 h Cre-Expression wurde die genomische DNA einzelner ES-Zell-Kolonien extrahiert (siehe 2.2.1.15) und auf die Exzision des *neo*-Gens durch *Southern* Blot untersucht (siehe 2.2.1.16).

### 3. Ergebnisse

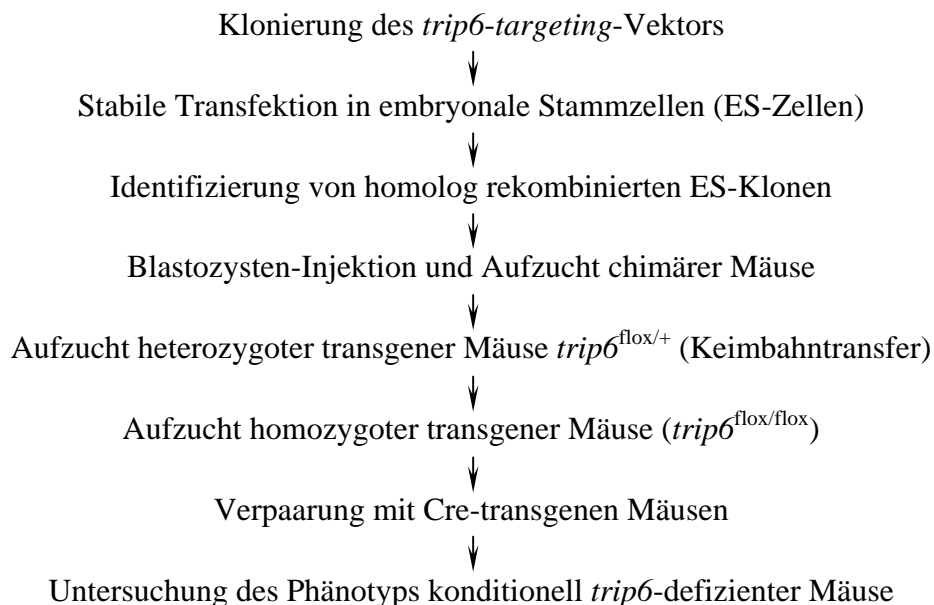
#### 3.1 Generierung einer konditionell *trip6*-defizienten Maus zur Untersuchung der Funktionen von Trip6 und nTrip6 *in vivo*

Trip6 ist ein intrazelluläres Adhäsionsmolekül und spielt eine Rolle bei der Modulation der Zellmigration (Yi et al., 2002; Xu et al., 2004; Lai et al., 2005; Sanz-Rodriguez et al., 2004; Gur'ianova et al., 2005; Takizawa et al., 2006; Worley et al., 2006). nTrip6 erfüllt wichtige Koaktivator-ähnliche Funktionen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B und ist darüber hinaus für die GR-vermittelte Transrepression dieser Transkriptionsfaktoren essentiell (Kassel et al., 2004). Die *in vivo* Bedeutung von Trip6 als ein Regulator der Zellmigration ist bisher unbekannt. Ebenso wurde die Rolle von nTrip6 als Schlüsselprotein in der Modulation der AP-1-, NF- $\kappa$ B- und GR-regulierten Genexpression *in vivo* bislang noch nicht untersucht.

Trip6 und nTrip6 sind Protein-Isoformen der *trip6*-Genexpression (Kassel et al., 2004). Zur Untersuchung ihrer Funktionen *in vivo*, sollte daher die *trip6*-Genexpression in der Maus inaktiviert werden. Der Verlust der Trip6-Isoformen könnte mögliche Phänotypen zur Folge haben, die Aufschluss über ihre Funktionen *in vivo* geben können. Da die Aminosäuresequenz von nTrip6 bisher nicht bekannt ist, können Trip6 Isoform-spezifische Funktionen *in vivo* jedoch nicht untersucht werden. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der molekulare Mechanismus, der zur Bildung von nTrip6 führt identifiziert werden. Anhand dieses Wissens können *trip6*-defiziente Mäuse rekonstituiert werden, um *in vivo* Rückschlüsse auf die spezifischen Trip6-Isoformen vermittelten Funktionen zu gewinnen.

Es wird derzeit vermutet, dass die GR-vermittelte Transrepression für die „normale“ Embryonalentwicklung der Maus essentiell ist (Reichardt et al., 1998). Des weiteren ist die transkriptionelle Aktivität von AP-1 und NF- $\kappa$ B ebenfalls absolut erforderlich für die murine Embryonalentwicklung (Hilberg et al., 1993; Beg et al., 1995; Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass nTrip6 eine wichtige Rolle in der GR-vermittelten Transrepression, als auch in der Modulation der AP-1 und NF- $\kappa$ B abhängigen Genexpression spielt (Kassel et al., 2004). Der Verlust von nTrip6 durch einen konventionellen *trip6* Knock-out könnte daher zu einem embryonal lethalen Phänotyp führen. Für die Untersuchung der Trip6-Isoformen Funktionen *in vivo* sollte daher eine konditionell *trip6*-defiziente Mauslinie etabliert werden.

Die Generierung von konditionell Gen-defizienten Mauslinien ist heutzutage eine Standardmethode um die Funktionen bestimmter Gene *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wird routinemäßig das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet. In diesem System vermittelt die DNA-Rekombinase Cre die spezifische Deletion eines Genabschnitts zwischen zwei Erkennungssequenzen (loxP-Sequenzen), die mit gleicher 5'-3'-Orientierung in den Genlokus inseriert sind. Da sich die Cre-Rekombinase gewebespezifisch und bei Wahl eines induzierbaren Promotors auch zeitlich definiert in der Maus exprimieren lässt, kann sowohl der Ort als auch der Zeitpunkt der Deletion in der Maus festgelegt werden. Für die konditionelle Deletion des *trip6*-Gens musste daher eine transgene Mauslinie etabliert werden, in der das *trip6*-Allel homozygot von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird (*trip6*<sup>flox/flox</sup>). Die hierfür erforderlichen Arbeitsschritte sind schematisch in Abbildung 8 zusammengefasst.



**Abb. 8: Zusammenfassung der experimentellen Schritte zur Etablierung der *trip6*<sup>flox/flox</sup> und der konditionell *trip6*-defizienten Mauslinie.**

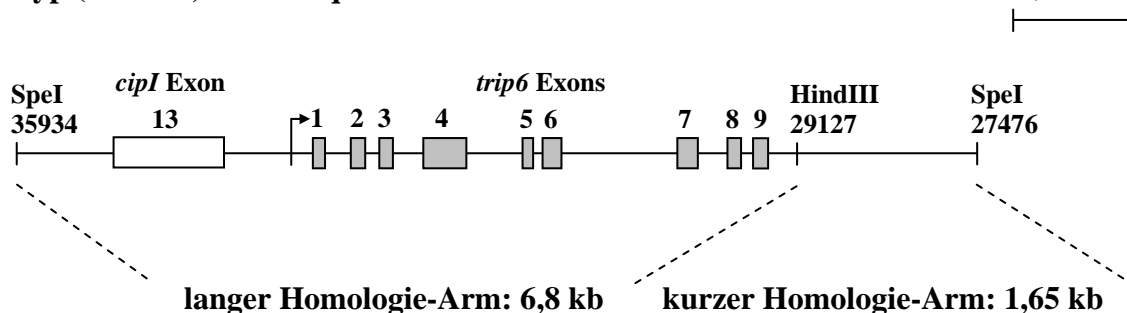
Zur Einbringung von loxP-Sequenzen in den *trip6*-Genlokus wird ein so genannter *trip6*-targeting-Vektor kloniert, der die homologe Sequenz des *trip6*-Genlokus, inklusive der flankierenden loxP-Sequenzen enthält. Der *trip6*-targeting-Vektor wird dann in murine embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert und kann so den *trip6*-Wildtyp-Genlokus durch homologe Rekombination ersetzen. Die homologen Rekombinanten werden nach ihrer Identifizierung in Blastozysten injiziert. Werden die Klone bei der Entwicklung mit einbezogen, entwickeln sich genetisch chimäre Mäuse. Differenzieren sich die Klone in der Chimäre auch zu Keimbahnzellen spricht man vom Keimbahntransfer. Nur Chimären mit Keimbahntransfer, können für die Aufzucht von homozygoten *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mäuse verwendet werden. Die *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mäuse werden dann mit Cre-transgenen Mäusen verpaart. Je nach Expressionsmuster des *cre*-Gens kann *trip6*<sup>flox/flox</sup> zeitlich und auch örtlich inaktiviert werden. Phänotypen einer konditionellen *trip6*-defizienten Maus können dadurch in allen Entwicklungsstadien und bestimmten Geweben untersucht werden.

### 3.1.1 Strategie und Klonierung des *trip6-targeting*-Vektors

Die homologe Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors sollte in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die aus Mäusen der Linie 129/Ola gewonnen wurden, erfolgen. Um eine effiziente homologe Rekombination zu erreichen, wurde daher für die Klonierung des *trip6-targeting*-Vektors die genomische DNA der gleichen Linie verwendet. Innerhalb dieser DNA (Chromosom 5), enthält der Abschnitt 35934 bis 27476 die vollständige *trip6*-Gensequenz und ist mit 8,4 kb lang genug, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten (Thomas und Capecchi, 1987; Deng und Capecchi, 1992). Darüber hinaus wird dieser Abschnitt von zwei *SpeI*-Schnittstellen flankiert, die ihn für eine einfache Isolierung aus der genomischen DNA zugänglich machen. Zur Einführung eines Selektionsmarkergens wurde der DNA-Abschnitt durch einen *HindIII*-Restriktionsverdau in zwei Abschnitte, den langen und kurzen Homologie-Arm, unterteilt. Der lange Arm enthält das vollständige *trip6*-Gen von Exon eins bis neun und das letzte Exon des stromaufwärts liegenden *cipI*-Gens. Der kurze Arm enthält die vom *trip6*-Gen stromabwärts gelegene nicht-kodierende Sequenz (Abb. 9).

#### Wildtyp (129/Ola) DNA-Sequenz 35934 bis 27476

Maßstab: 1 kb = 1,5 cm



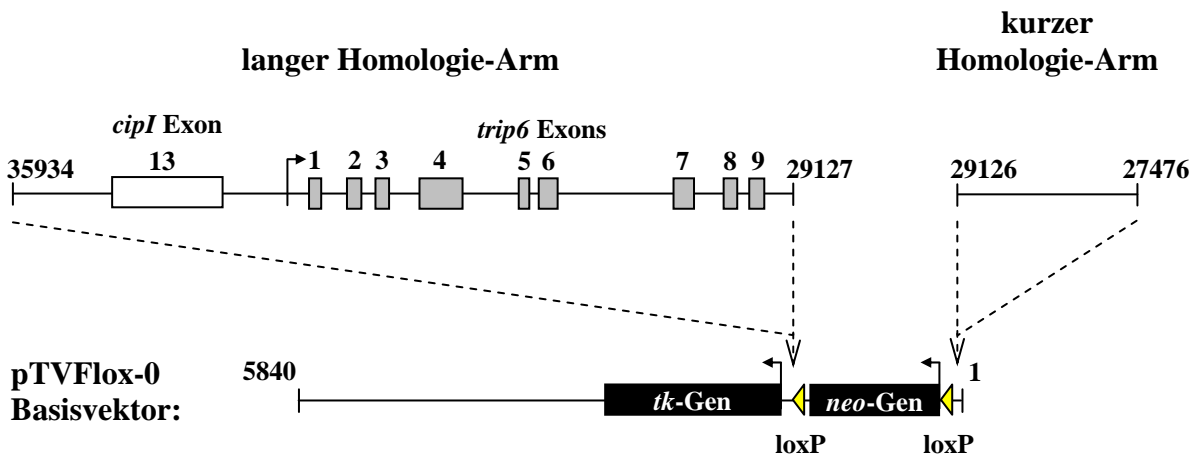
#### Abb. 9: Schematische Darstellung des langen und kurzen Homologie-Arms

Ein Kosmid, das die DNA-Sequenz 35934 bis 27476 (NCBI Acc. Nr.: AF312033) enthält wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *HindIII* verdaut. Der daraus resultierende lange 6,8 und kurze 1,65 kb Homologie-Arm wurde durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert und separat in Vektoren ligiert. Der *trip6*-Transkriptionsstart ist als Pfeil und die *trip6*-Exons sind als graue Boxen dargestellt. Das letzte Exon des stromaufwärts liegenden Gens ist als weiße Box dargestellt. Die durchgezogenen Linien stellen die nicht-kodierenden Sequenzen dar.

Beide Homologie-Arme wurden für die Klonierung des *trip6-targeting*-Vektors in den Basis-Vektor pTVFlox-0 eingefügt. Der pTVFlox-0 Basis-Vektor enthält das Selektionsmarkergen Thymidin-Kinase (*tk*), sowie das von zwei loxP-Sequenzen flankierte (gefloxte) Selektionsmarkergen Aminoglykosid-Phosphotransferase (*neo*). Das gefloxte *neo*-Gen dient

der positiven Selektion von stabil rekombinierten ES-Zellen und muss daher in den Homologie-Abschnitt, zwischen die beiden Arme integriert werden. Das *tk*-Gen kann zur negativen Selektion von nicht homolog rekombinierten ES-Zellen benutzt werden und wurde daher außerhalb des homologen Bereichs stromaufwärts des langen Homologie-Arms kloniert (Abb. 10).

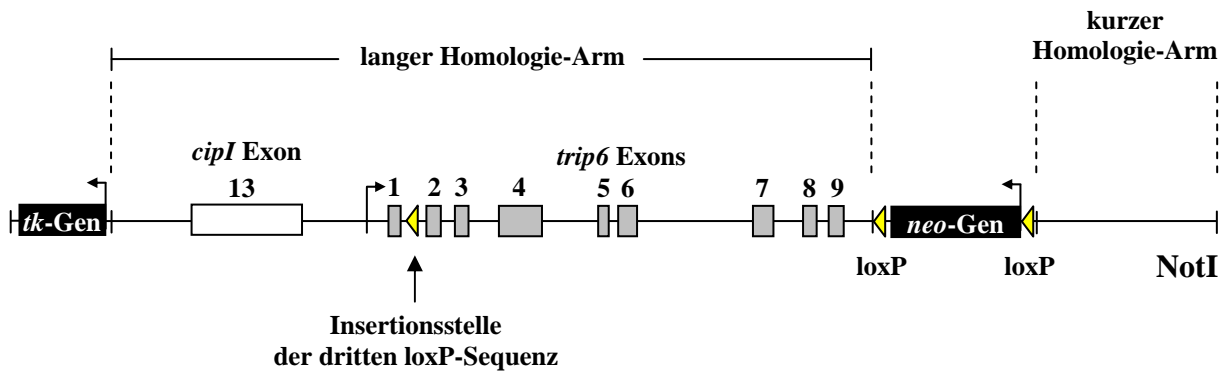
Maßstab: 1 kb = 1,5 cm



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Einführung des langen und kurzen Homologie-Arms in den pTVFlox-0 Basisvektor**

Der pTVFlox-0 Basisvektor ist zur Vereinfachung linear in 3'-5'-Orientierung dargestellt. Das *tk*-Gen und das *neo*-Gen sind als schwarze Boxen dargestellt und die Pfeile zeigen deren Transkriptionsstarts an. Das *neo*-Gen wird von zwei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung (5'→3') flankiert, die als gelbe Dreiecke dargestellt sind. Der kurze Homologie-Arm wurde stromabwärts vom geflochtenen *neo*-Gen inseriert. Der lange Homologie-Arm wurde zwischen das geflochte *neo*-Gen und dem *tk*-Gen eingefügt.

Die Cre-Rekombinase vermittelt die spezifische Deletion einer Sequenz, die von zwei loxP-Elementen gleicher 5'-3'-Orientierung flankiert ist. Um eine Cre-Rekombinase-vermittelte Inaktivierung des *trip6*-Gens zu ermöglichen, wurde eine dritte loxP-Sequenz in den langen Homologie-Arm zwischen die *trip6* Exons zwei und drei inseriert (Abb. 11). Dadurch wird eine Cre-vermittelte Exzision der *trip6*-Exons zwei bis neun ermöglicht, wonach nur der *trip6*-Promotor und das Exon eins im entsprechenden Genlokus zurückbleiben. Die Transkription dieses trunkierten *trip6*-Gens führt zu einer mRNA mit einem vorzeitigen Stop-Kodon, die durch den *nonsense-mediated-mRNA-decay* Mechanismus abgebaut wird (Maquat, 2004). Dadurch kommt es zur Inaktivierung der *trip6*-Genexpression.

***trip6*-targeting-Vektor****Abb. 11: Schematische Darstellung des *trip6*-targeting-Vektors**

Der *trip6*-targeting-Vektor ist in linearer 3'-5'-Orientierung dargestellt. Die Insertion der dritten loxP-Sequenz (5'→3') erfolgte zwischen den *trip6*-Exons eins und zwei. Die NotI-Restriktionsschnittstelle dient der Linearisierung des Vektors. Die Linearisierung des *trip6*-targeting-Vektors ist erforderlich für seine homologe Rekombination mit der genomischen DNA in den ES-Zellen.

Die Insertion einer dritten loxP-Sequenz sollte die Integrität des Genoms nicht beeinflussen. Daher wurde bei der Insertion darauf geachtet, dass weder die *trip6*-Genexpression, noch die des stromaufwärts gelegen *cipI*-Gens beeinträchtigt wird. Um die *trip6*-Genexpression nicht zu beeinflussen wurde die dritte loxP-Sequenz an eine Position inseriert, die das Spleißen der Trip6-prä-mRNA nicht beeinflusst. Des Weiteren ist durch diese Position sichergestellt, dass nach Cre-vermittelter Exzision keine vom *trip6*-Gen stromaufwärts gelegenen Sequenzen deletiert werden, die für die Expression des *cipI*-Gens benötigt werden könnten.

Die Klonierung des *trip6*-targeting-Vektors ist im Methodenabschnitt 2.2.2 detailliert beschrieben. Um zu überprüfen, dass keine ungewollten Mutationen in den *trip6*-Genloкус integriert werden, wurde die korrekte Sequenz des *trip6*-targeting-Vektors durch Sequenzierung bestätigt.

### **3.1.2 Stabile Transfektion des *trip6-targeting*-Vektors in embryonale Stammzellen und Identifizierung homolog rekombinierter Stammzellen**

Die homologe Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors mit dem *trip6*-Wildtyp-Allel sollte in der ES-Zelllinie HM-1 erfolgen. Hierfür wurde der *trip6-targeting*-Vektor mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert (Abb. 11) und durch Elektroporation in die ES-Zellen transfiziert.

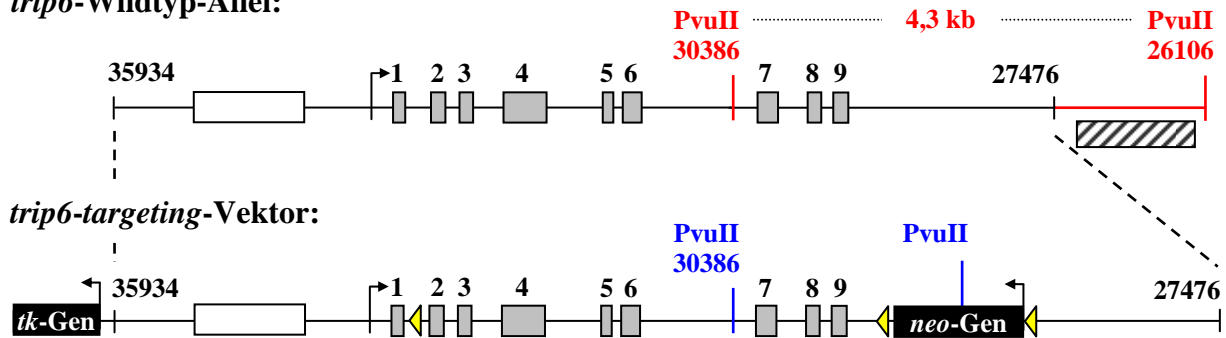
Die ES-Zellen, die den *trip6-targeting*-Vektor stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden mittels Neomycin-Behandlung positiv selektioniert. ES-Zellen mit einer zufälligen *trip6-targeting*-Vektor Integration können durch eine Behandlung mit Gancyclovir negativ selektioniert werden. Gancyclovir ist ein Substrat der Thymidin-Kinase (*tk*), die außerhalb (stromaufwärts) des langen Homologie-Arms liegt. Nur im Fall einer zufälligen Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors mit der genomischen DNA, wird auch das *tk*-Gen rekombiniert und setzt Gancyclovir in eine für die ES-Zellen toxische Reagenz um. Nicht-homolog rekombinierte ES-Zellen werden dadurch negativ selektioniert. Da jedoch Gancyclovir selbst auch toxisch für die homolog rekombinierten Stammzellen sein kann, wurde auf die negative Selektion verzichtet.

Insgesamt 288 der Neomycin resistente ES-Zellklone wurden isoliert und durch die in Abbildung 12 A dargestellte Southern-Blot-Strategie auf eine homologe Rekombination mit dem *trip6-targeting*-Vektor hin untersucht. Durch die homologe Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors mit dem Wildtyp-Allel erhält das rekombinierte Allel eine zusätzliche PvuII-Restriktionsschnittstelle. Ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease PvuII schneidet aus dem rekombinierten Allel ein DNA-Fragment mit 3,6 kb und aus dem Wildtyp-Allel ein Fragment mit 4,3 kb. Beide Fragmente können durch die radioaktiv markierte Probe 27292 bis 26254 spezifisch detektiert werden (Abb. 12A).

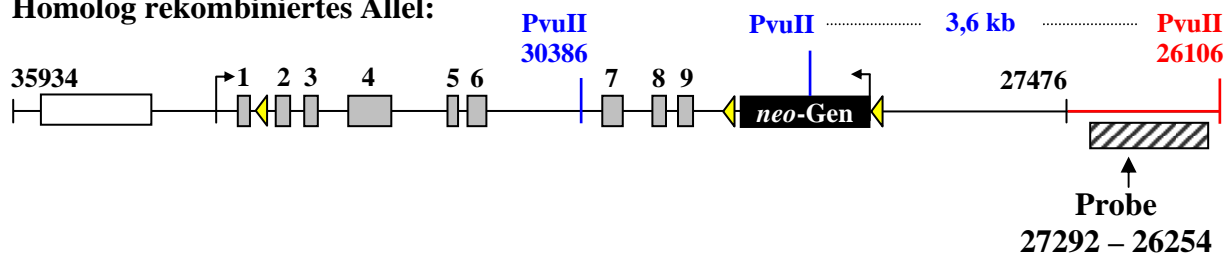


A)

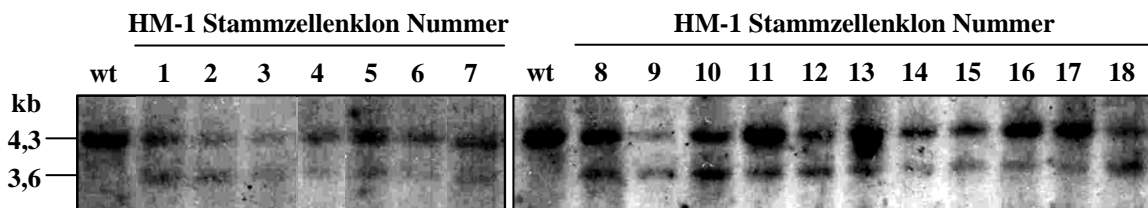
*trip6*-Wildtyp-Allel:



Homolog rekombiniertes Allel:



B)



**Abb. 12: Identifizierung homologer Rekombination des *trip6*-targeting-Vektors in HM-1 ES-Zellen durch die Southern-Blot-Methode**

A) Schematische Darstellung des *trip6*-Wildtyp-Allels, des *trip6*-targeting-Vektors und des homolog rekombinierten Allels. Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der homologen Rekombination des Wildtyp-Allels mit dem *trip6*-targeting-Vektor an. Das daraus resultierende homolog rekombinierte Allel ist darunter gezeigt. Die *trip6*-Exons sind als graue Boxen und die loxP-Sequenzen sind als gelbe Dreiecke abgebildet. Die PvuII-Restriktionstellen des Wildtyp-Allels sind in rot und die des *trip6*-targeting-Vektors sind in blau dargestellt. Die für den Southern-Blot verwendete radioaktiv markierte Probe ist als quergestreifte Box gezeigt. Die Probe hybridisiert mit der Sequenz 27292 bis 26254 stromabwärts des kurzen Homologie-Arms (rote Linie). B) Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone durch Southern-Blot. Die genomische DNA des Wildtyps (wt) und von 288 Neomycin resistenten ES-Zellklonen wurde isoliert und über Nacht mit der Endonuklease PvuII verdaut. Die DNA-Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, durch die Southern-Blot-Methode auf eine Membran transferiert und mit der radioaktiv markierten Probe detektiert. Der Southern-Blot zeigt die Kontrolle (wt), sowie 18 homolog rekombinierte ES-Zellklone, die aus 288 stabil rekombinierten ES-Zellklonen identifiziert wurden.

Aus 288 Neomycin resistenten HM-1 ES-Zellklonen wurden 18 identifiziert, die homolog mit dem *trip6-targeting*-Vektor rekombiniert waren. In allen Klonen kann das Fragment des Wildtyp Allels mit 4,3 kb, sowie das Fragment des homolog rekombinierten Allels mit 3,6 kb detektiert werden (Abb. 12B). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die homologe Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors, das gefloخته *neo*-Gen in die vorhergesehen Position des *trip6*-Genlokus der Klone eins bis 18 integriert wurde.

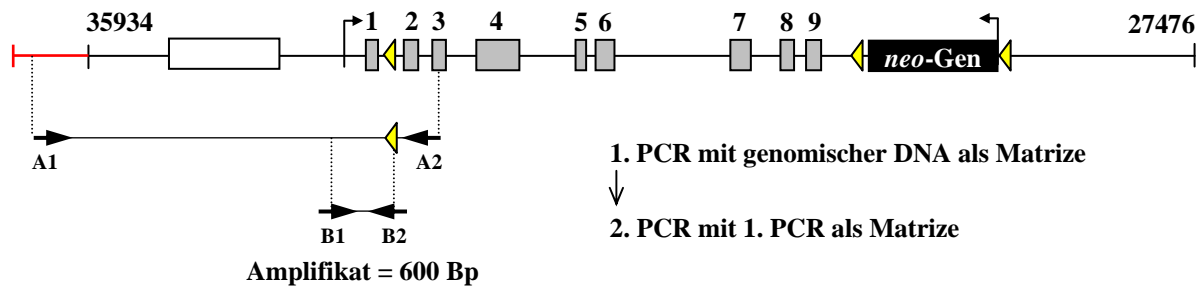
Um zu überprüfen, ob auch die dritte loxP-Sequenz in den vorhergesehen *trip6*-Genlokus integriert wurde, wurde die in Abbildung 13A dargestellte PCR-Strategie angewandt. Hierbei wurde die DNA der positiven Klone stromaufwärts des langen Homologie-Arms und stromabwärts der dritten loxP-Sequenz amplifiziert. Das Amplifikat des homolog rekombinierten Allels enthält die dritte loxP-Sequenz, das Amplifikat des Wildtyp-Allels jedoch nicht. Diese PCR-Reaktion wurde als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion verwendet. Durch diese PCR-Strategie können nur Produkte amplifiziert werden, wenn die Matrize die dritte loxP-Sequenz des homolog rekombinierten Allels enthält. Zur Kontrolle von spezifischen Produkten wurde die erste PCR-Reaktion mit und ohne DNA-Polymerase durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde die genomische DNA von Wildtyp ES-Zellen verwendet.

Das Ergebnis der zweiten PCR-Reaktion in Abbildung 13B zeigt, dass von der genomischen DNA der ES-Zellklone 10, 11, 12 und 15 jeweils ein Produkt der erwarteten Größe mit 600 bp amplifiziert wird (Spuren 3, 5, 7 und 9). Diese Produkte können nicht amplifiziert werden, wenn die erste PCR-Reaktion ohne DNA-Polymerase erfolgt (Spuren 4, 6, 8 und 10), oder wenn genomische Wildtyp DNA verwendet wird (Spur 1 und 2). Daher ist in die genomische DNA der Klone 10, 11, 12 und 15, neben dem gefloختen *neo*-Gen, auch die dritte loxP-Sequenz durch homologe Rekombination mit dem *trip6-targeting*-Vektor integriert worden.

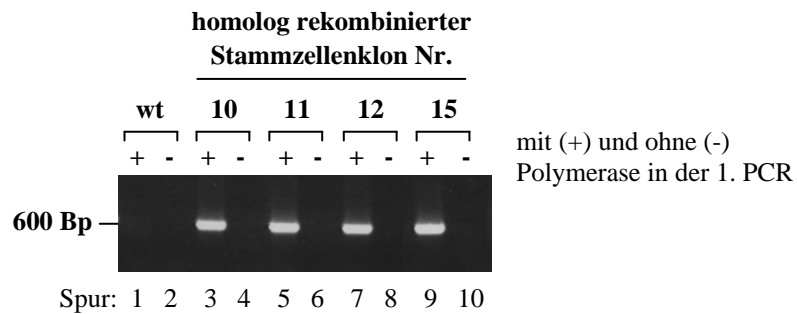
Aus 288 Neomycin resistenten Klonen konnten daher vier identifiziert werden, die das gefloخته *neo*-Gen als auch die dritte loxP-Sequenz in den vorhergesehen *trip6*-Genlokus integriert haben. Daraus ergibt sich für den *trip6-targeting*-Vektor eine homologe Rekombinationseffizienz von 1,3 Prozent.

A)

**Homolog rekombiniertes Allel:**



B)



**Abb. 13: Kontrolle der dritten loxP-Sequenz Integration in die genomische DNA der homolog rekombinierten ES-Zellklone.**

A) Schematische Darstellung des homolog rekombinierten Allels. Die *trip6*-Exons sind als graue Boxen und die loxP-Sequenzen sind als gelbe Dreiecke abgebildet. Die Sequenz stromaufwärts vom langen Homologie-Arm ist durch eine rote Linie dargestellt. Die für die erste PCR-Reaktion verwendeten Primer liegen stromaufwärts des langen Homologie-Arms (A1 = MT6g35995\_for) und im *trip6*-Exon 3 (A2 = MT6g32712\_rev). Die für die zweite PCR-Reaktion verwendeten Primer liegen an Position 33577 (B1 = MT6g33577\_for) und in der loxP-Sequenz (B2 = loxP3\_rev). Das Amplifikat der zweiten PCR-Reaktion hat eine berechnete Länge von 600 Basenpaaren (bp).

B) Zweite PCR-Reaktion mit genomischer DNA von Wildtyp (wt) ES-Zellen und von den homolog rekombinierten Klonen 10, 11, 12 und 15. Die genomische DNA der ES-Zellen wurde isoliert und jeweils 1/10 für die erste PCR-Reaktion mit (+) und ohne (-) DNA-Polymerase eingesetzt. Danach wurden jeweils 1/10 der vorangegangenen Reaktionen für die zweite PCR-Reaktion eingesetzt. Die Detektion der Produkte erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese.

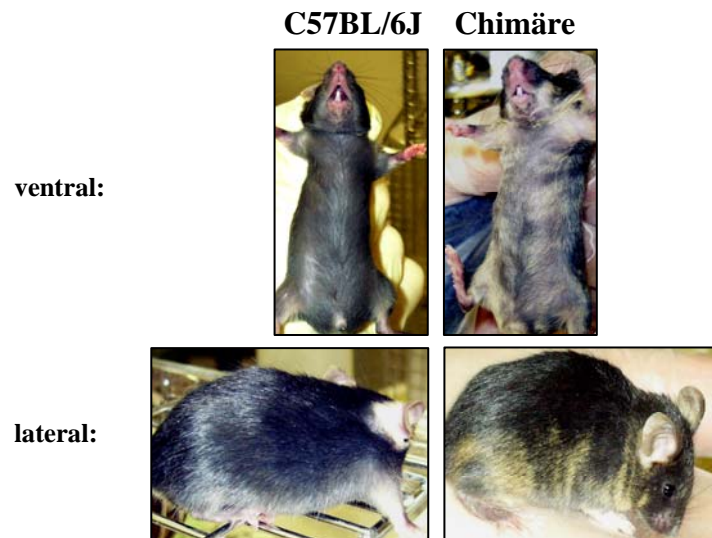
### **3.1.3 Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des *neo*-Gens in den homolog rekombinierten ES-Zellklonen**

Die genomische Position des geflochten Selektionsmarkergens *neo* wurde so gewählt, dass die *trip6*-Genexpression, sowie die des stromabwärts gelegenen Gens nicht beeinflusst werden sollte (siehe Abschnitt 3.1.1). Da aber ein störender Einfluss des geflochten *neo*-Gens nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, sollte es durch transiente Cre-Rekombinase Expression in den homolog rekombinierten ES-Zellklonen deletiert werden. Nach allen durchgeführten transienten Transfektionen des Cre-Rekombinase-Vektors differenzierten die ES-Zellklone jedoch stark aus, so dass sie für die weitere Generierung einer *trip6*-defizienten Maus nicht verwendet werden konnten. Daher wurde auf die Deletion des geflochten *neo*-Gens verzichtet und nur die nicht transfizierten Klone weiterverwendet.

### **3.1.4 Blastozysteninjektion und Transfer in pseudoschwangere Mäuse**

Für die Generierung einer *trip6*-defizienten Maus wurde der ES-Zellklon 10 gewählt (Abb. 12B und 13B), da er in Kultur die beste Morphologie undifferenzierte Stammzellen zeigte. Der ES-Zellklon 10 der Mauslinie 129/Ola (*agouti* Fellfarbe) wurde in Blastozysten der Mauslinie C57BL/6J (schwarze Fellfarbe) injiziert und anschließend in den Uterus pseudoschwangerer Mäuse transferiert. Diese Arbeiten wurden von Frau Yvonne Petersen durchgeführt. Werden bei der Entwicklung der Blastozyste die injizierten ES-Zellen miteinbezogen, entstehen Chimäre Nachkommen. Der Grad des Chimärismus lässt sich anhand der Fellfarbe erkennen. Je höher der *agouti* Farbanteil, desto wahrscheinlicher ist es, dass sich die injizierten ES-Zellen auch zu Keimbahnzellen differenziert haben.

Aus dem Transfer der injizierten Blastozysten entwickelten sich eine männliche und zwei weibliche Chimäre, von denen eine repräsentativ in Abbildung 14 dargestellt ist. Der Anteil der *agouti* Fellfarbe zeigt, dass der Klon 10 in die transgene Maus integriert wurde (Abb. 14).



**Abb. 14: Vergleich einer der weiblichen Chimären mit einer Maus der Linie C57BL/6J.** Ventrale und laterale Aufnahme der Fellfarbe einer Maus der Linie C57BL/6J (links) und einer der Chimären bestehend aus Zellen der Linie C57BL/6J und den Zellen des Klons 10 der Linie 129/Ola (rechts).

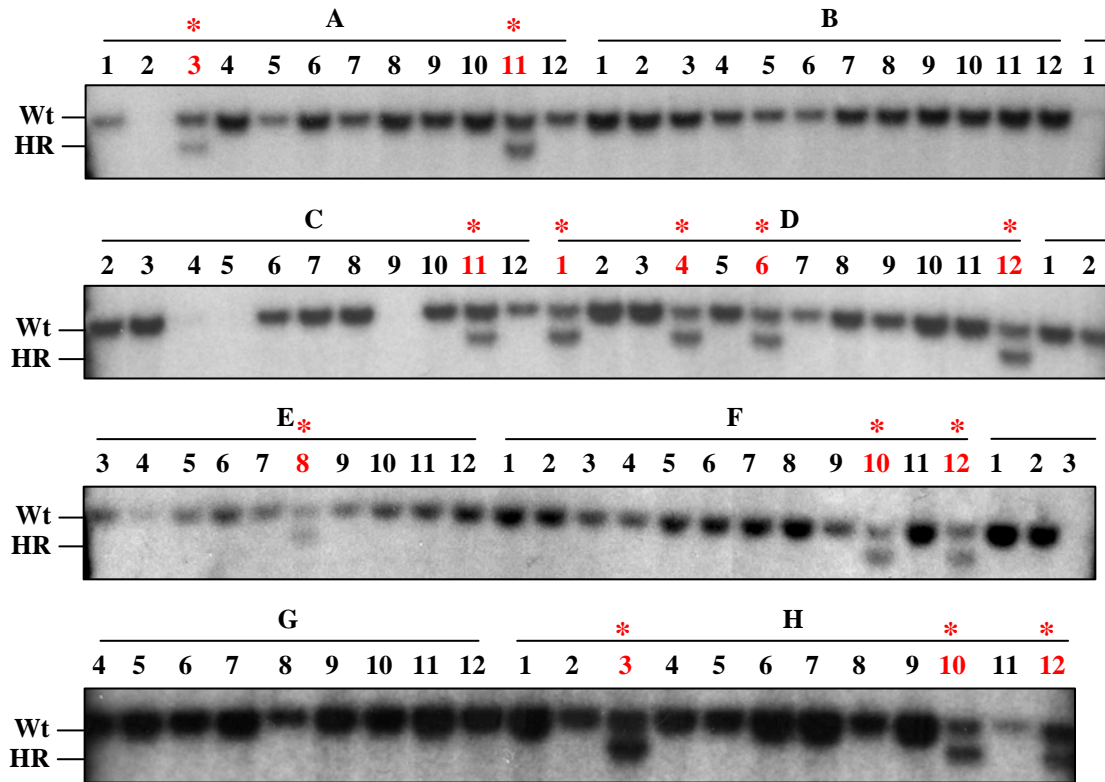
Für die Generierung einer *trip6*-defizienten Maus ist der Keimbahntransfer des Klons 10 unerlässlich. Die *agouti* Fellfarbe der Mauslinie 129/Ola wird dominant und die schwarze Fellfarbe der Linie C57BL/6J rezessiv vererbt. Den Mendelschen Regeln entsprechend führt die Verpaarung beider Linien zu Nachkommen (F1-Generation) mit ausschließlich schwarzer oder *agouti* Fellfarbe, im Verhältnis eins zu eins. Um zu überprüfen, ob sich einige der 129/Ola ES-Zellen des Klons 10 zu Keimbahnzellen differenziert haben, wurden die Chimären mit Mäusen der Linie C57BL/6J verpaart. Die F1-Generation dieser Verpaarung brachte nur Nachkommen mit schwarzer Fellfarbe hervor. Daher konnte der Keimbahntransfer leider nicht erzielt werden.

Da mit der verwendeten HM-1 ES-Zelllinie kein Keimbahntransfer erfolgte, wurde beschlossen die bisher durchgeführten Experimente mit einer anderen ES-Zelllinie (E14.1) zu wiederholen.

### 3.1.5 Stabile Transfektion des *trip6-targeting*-Vektors in E14.1 ES-Zellen und Identifizierung homologer Rekombinanten

Um eine homologe Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors in E14.1 ES-Zellen zu erreichen, wurde wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben verfahren. Die ES-Zellen wurden mit dem *trip6-targeting*-Vektor transfiziert, durch Neomycin Behandlung selektioniert und 288 stabil rekombinierte ES-Zellklone isoliert. Die stabil rekombinierten Klone wurden dann

durch die in Abbildung 12A dargestellte Southern-Blot-Strategie auf homologe Rekombination mit dem *trip6-targeting*-Vektor hin untersucht. Aus insgesamt 288 stabil rekombinierten Klonen konnten 39 Klone als homolog rekombiniert identifiziert werden. Hiervon sind 13 Klone in Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15: Identifizierung homologer Rekombination des *trip6-targeting*-Vektors in E14.1 ES-Zellen durch die Southern-Blot-Methode**

Die genomische DNA von 288 Neomycin resistenten ES-Zellklonen wurde isoliert und über Nacht mit PvuII verdaut. Die DNA-Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, durch die Southern-Blot-Methode auf eine Membran transferiert und mit der radioaktiv markierten Probe (27292 bis 26254, Abb. 12A) detektiert. Die Größen des Wildtyp- (Wt) und homolog rekombinierten Fragments (HR) sind links gezeigt. Die Nummern der homolog rekombinierten E14.1 ES-Stamzellen sind in rot mit Stern (\*) dargestellt. Die Southern-Blot-Tests der anderen 192 Neomycin resistenten E14.1 ES-Zellen sind nicht gezeigt.

Das Ergebnis in Abbildung 15 zeigt, dass von insgesamt 96 ES-Zellklonen 13 das gefloxt *neo*-Gen in den vorhergesehenen *trip6*-Genloкус integriert haben. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob auch die dritte loxP-Sequenz in den vorhergesehenen *trip6*-Genloкус integriert wurde. In allen positiven Klone könnte dann das gefloxt *neo*-Gen durch transiente Cre-Rekombinase Expression deletiert werden. Zur Etablierung der *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mauslinie sollten dann alle positiven Klone in Blastozysten injiziert werden. Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit die weiteren erforderlichen Schritte zur Generierung einer *trip6*-defizienten

Maus nicht fertig gestellt werden. Die bisher in dieser Arbeit generierten homolog rekombinierten E14.1 ES-Zellklone werden jedoch derzeit zur Generierung einer *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mauslinie verwendet. Durch die anschließende Verpaarung der *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mauslinie mit verschiedenen Cre-transgenen Mäusen können dann bestimmte konditionell *trip6*-defiziente Mauslinie generiert werden. Die konditionelle Inaktivierung des *trip6*-Gens innerhalb dieser Mauslinie wird zum Verlust beider *trip6*-Isoformen, Trip6 und nTrip6, führen und ihre Funktionen können *in vivo* untersucht werden.

Bislang konnte die nTrip6 Aminosäuresequenz und der molekulare Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt nicht identifiziert werden. Um die Funktionen der *trip6*-Isoformen *in vitro* und *in vivo* voneinander getrennt untersuchen zu können, war es daher erforderlich den molekularen Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt zu identifizieren. Durch dieses Wissen können zukünftig *trip6*-defiziente Zellen, oder konditionell *trip6* defiziente Mäuse, entweder nur durch Trip6 oder nTrip6 rekonstituiert werden und die Funktionen der *trip6*-Isoformen voneinander getrennt *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden.

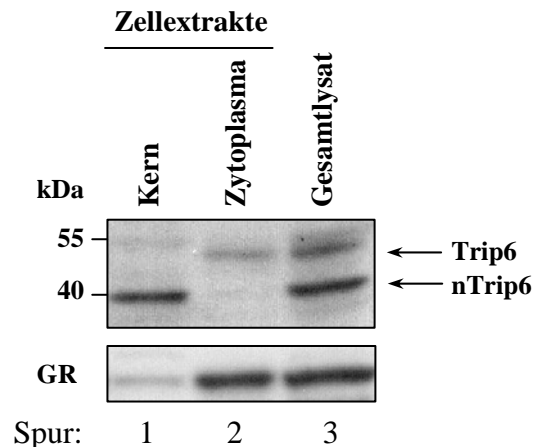
## **3.2 Identifizierung des molekularen Mechanismus der nTrip6 Expression**

### **3.2.1 Endogenes nTrip6 hat ein Molekulargewicht von 40 kDa und ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert**

Bei der *trip6* Genexpression entsteht neben dem Trip6 Protein (Lee et al. 1995; Yi und Beckerle, 1998) die ausschließlich nukleäre Trip6 Isoform nTrip6 (Kassel et al., 2004). nTrip6 übernimmt im Nukleus wichtige Koaktivator-ähnliche Funktionen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B und ist darüber hinaus essentiell für die GR-vermittelte Transrepression dieser Transkriptionsfaktoren (Kassel et al., 2004). Trip6 hingegen ist im Zytosol lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Zellmigration (Yi et al., 2002; Xu et al., 2004; Lai et al., 2005; Sanz-Rodriguez et al., 2004; Gur'ianova et al., 2005; Takizawa et al., 2006; Worley et al., 2006).

Die Aminosäuresequenz von nTrip6 sowie der molekulare Mechanismus der zur Produktion von nTrip6 führt sind bisher unbekannt. Die theoretische Anzahl von Aminosäuren eines Proteins mit bekanntem Molekulargewicht, lässt sich durch das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure berechnen. Um die theoretische Länge der nTrip6 Aminosäuresequenz rechnerisch bestimmen zu können, wurde daher zuerst das

Molekulargewicht von endogenem nTrip6 anhand eines Protein-Größenmarkers ermittelt (Abb.16). Hierfür wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte aus unstimulierten HeLa-Zellen hergestellt und die Trip6 Proteine anhand der Western-Blot-Methode mit einem Trip6-Antikörper detektiert. Als Kontrolle für die Reinheit der Kernextraktion wurden Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor (GR) verwendet, da GR in unstimulierten Zellen nur im Zytosol und nicht im Kern zu finden sein sollte (Yamamoto, 1985; Beato, et al., 1995).



**Abb. 16: Endogenes nTrip6 hat ein Molekulargewicht von 40 kDa**

Für die Bestimmung des Molekulargewichts von nTrip6 wurde Gesamtlysats von  $2 \times 10^7$  HeLa-Zellen gewonnen und zur Hälfte für die Extraktion von Kern- und Zytoplasma verwendet. Je 1/10 des Kernextrakts (Spur 1), Zytoplasmaextrakts (Spur 2) und Gesamtlysats (Spur 3) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, die Gesamtproteine durch Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit einem polyklonalem Trip6-Antiserum oder einem GR-Antikörper detektiert. Letzteres diente der Reinheitskontrolle des Kernextrakts (Spur 1).

Der Western-Blot in Abbildung 16 zeigt, dass durch die Trip6-Immunhybridisierung des Gesamtlysats zwei Trip6 Proteine unterschiedlicher Größe detektiert werden (Spur 3). Das langsamer migrierende 50 kDa große Trip6 Protein kann nur im Zytoplasmaextrakt (Spur 2), jedoch nicht im Kernextrakt nachgewiesen werden (Spur 1). Die schneller migrierende nTrip6 Isoform wird ausschließlich im Kernextrakt detektiert und zeigt ein Molekulargewicht von 40 kDa (Spur 1). Es wird kein nTrip6 im Zytoplasmaextrakt detektiert (Spur 2). Der GR wird im Vergleich zum Zytoplasmaextrakt nur minimal im Kernextrakt detektiert (Vgl. Spur 1 und 2). Dies deutet auf eine vernachlässigbare Verunreinigung des Kernextrakts durch Zytoplasma hin. Dieses Ergebnis zeigt, dass endogenes nTrip6 ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist und ein Molekulargewicht von 40 kDa besitzt. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich nun eine theoretische nTrip6 Aminosäuresequenz erstellen. Sie basiert auf dem Vergleich drei bekannter Charakteristika von Trip6 und nTrip6:

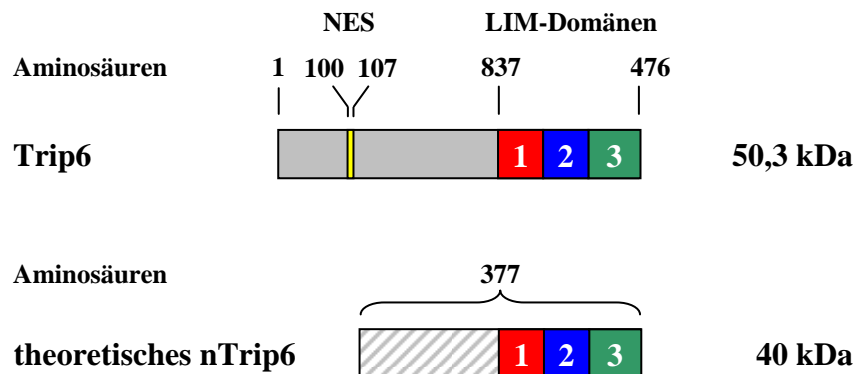


1. Trip6 besteht aus 476 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 50,3 kDa (Lee et al. 1995; Yi und Beckerle, 1998). Daher beträgt das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure des Trip6 Proteins 106 Dalton. Geht man vom gleichen Durchschnittswert für das 40 kDa große nTrip6 Protein (Abb.16) aus, besteht eine theoretische nTrip6 Sequenz aus 377 Aminosäuren.

2. Trip6 besitzt eine nukleäre Exportsequenz, welche verantwortlich für seine zytosolische Lokalisation ist (Wang et al., 1999; Wang und Gilmore, 2001). Da nTrip6 ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist (Kassel, et al., 2004 und Abb. 16), sollte nTrip6 diese nukleäre Exportsequenz nicht besitzen.

3. Der Carboxyterminus des Trip6 Proteins enthält drei LIM-Domänen (Lee et al. 1995; Yi und Beckerle, 1998). Es wurde gezeigt, dass diese drei LIM-Domänen für die Funktion von nTrip6 notwendig sind (Kassel et al., 2004). Daher sollte nTrip6 die Aminosäuresequenz der drei LIM-Domänen enthalten.

Die aus diesen drei Punkten abgeleitete theoretische nTrip6-Sequenz ist in Abbildung 17 dargestellt und dient als Anhaltspunkt für die Identifizierung des molekularen Mechanismus der nTrip6 Expression.



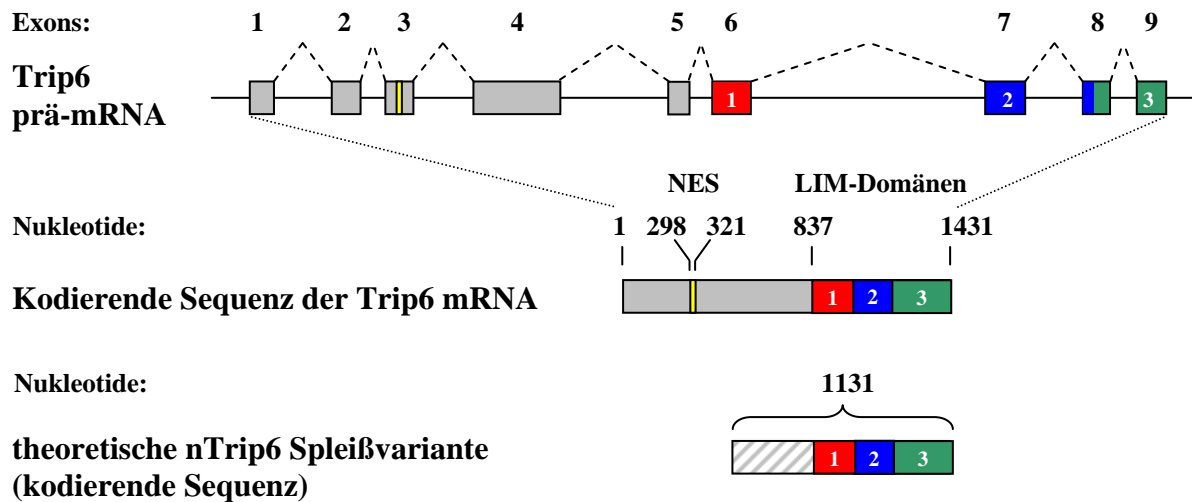
**Abb. 17: Schematische Darstellung von Trip6 und theoretischem nTrip6**

Trip6 hat eine Größe von 50,3 Kilo Dalton (kDa) und besteht aus 476 Aminosäuren. Es besitzt ein nukleäres Exportsignal (gelb) und drei carboxyterminale LIM-Domänen in rot, blau und grün dargestellt. Nukleäres Trip6 (nTrip6) hat ein Molekulargewicht von 40 kDa. Aus dem durchschnittlichen Molekulargewicht einer Aminosäure des Trip6 Proteins von 106 kDa, ergibt sich eine theoretische nTrip6 Sequenz aus 377 Aminosäuren. Aufgrund der nukleären Lokalisation sollte nTrip6 keine NES besitzen. Die Sequenz der drei LIM-Domänen ist für die Funktion von nTrip6 notwendig und sollte daher vorhanden sein.

### 3.2.2 Endogenes nTrip6 wird nicht durch alternatives Spleißen gebildet

Da nTrip6 aus Zellen nicht in ausreichenden Mengen für eine direkte Sequenzanalyse gewonnen werden konnte (eigene Vorarbeiten), musste alternativ der molekulare Mechanismus der zur Bildung von nTrip6 führt aufgeklärt werden. Hieraus lässt sich dann die nTrip6 Aminosäuresequenz ableiten. In der Sequenz-Datenbank dbEST ist eine Vielzahl von partiellen Trip6 Nukleotid-Sequenzen, den so genannten *expressed sequence tags* (EST), frei zugänglich (Boguski et al., 1993). Bei vielen der Trip6-ESTs sind unterschiedliche Sequenzabschnitte alternativ gespleißt. Darunter befinden sich auch ESTs, deren nukleäre Exportsequenz alternativ gespleißt wurde. Es wäre daher möglich, dass nTrip6 durch alternatives Spleißen der Trip6 prä-mRNA entsteht.

Die Trip6 prä-mRNA besteht aus neun Exons und acht Introns. Eine kurze Sequenz in Exon drei kodiert das nukleäre Exportsignal. Die Sequenzen der Exons sechs bis neun kodieren die drei LIM-Domänen. Die Trip6 mRNA entsteht durch konventionelles Spleißen aller acht Introns und besitzt eine kodierende Sequenz von 1431 Nukleotiden (Lee et al. 1995; Yi and Beckerle, 1998; Murthy et al. 1999; Wang und Gilmore 2001). Eine theoretische nTrip6 Spleißvariante, die das endogene nTrip6 Protein von 40 kDa kodiert, sollte eine kodierende Sequenz von 1131 Nukleotiden aufweisen, der die nukleäre Exportsequenz fehlt, jedoch die kodierende Sequenz aller drei LIM-Domänen enthält. Diese theoretische Variante kann daher nur durch alternatives Spleißen von 300 Nukleotiden im Bereich der ersten fünf Exons entstehen, wobei die nukleäre Exportsequenz mit einbezogen sein sollte (Abb. 18).



**Abb. 18: Schematische Darstellung des konventionellen Trip6 Spleißmusters und einer theoretischen nTrip6 Spleißvariante**

Die Trip6 prä-mRNA besteht aus neun Exons und acht Introns. Das konventionelle Spleißmuster der Introns ist durch gestrichelte Linien dargestellt. Die nukleäre Exportsequenz (NES) ist in gelb, die Sequenz der drei LIM-Domänen in rot, blau und grün dargestellt. Konventionelles Spleißen der Trip6 prä-mRNA führt zur Trip6 mRNA mit einer kodierenden Sequenz von 1431 Nukleotiden. Eine theoretische nTrip6 Spleißvariante, die das 40 kDa große nTrip6 Protein kodiert, sollte aus 1131 Nukleotiden bestehen und die Sequenz der drei LIM-Domänen enthalten. Aufgrund der nukleären Lokalisation des nTrip6 Proteins sollte ihr die nukleäre Exportsequenz fehlen. Eine solche theoretische Variante kann nur durch Spleißen von 300 Nukleotiden, einschließlich der nukleären Exportsequenz, im Bereich der ersten 5 Exons entstehen.

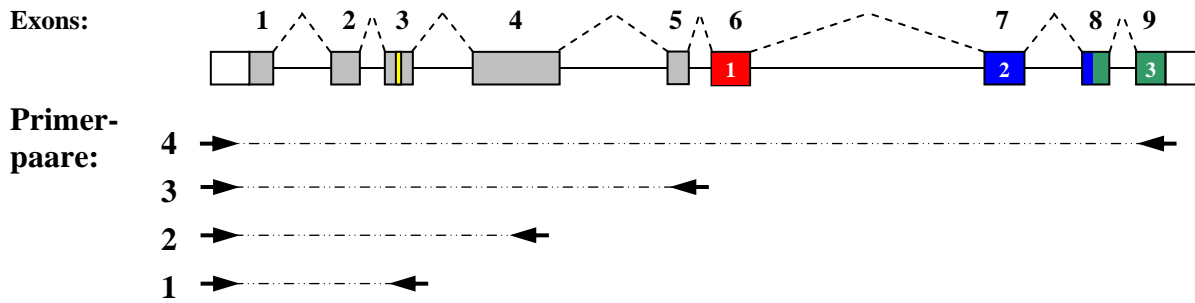
Für die Identifizierung von Trip6 Spleißvarianten wurde eine RT-PCR-Reaktion von Gesamt-RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten (3T3-Zellen) und humanen Zervixkarzinom Epithelzellen (HeLa-Zellen) durchgeführt (Abb. 19).

Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus HeLa- und 3T3-Zellen extrahiert und für die Herstellung zellulärer Gesamt-cDNA revers transkribiert. Die reverse Transkription (RT) wurde zur Kontrolle einer möglichen genomischen DNA-Kontamination mit und ohne reverses Transkriptase-Enzym durchgeführt.

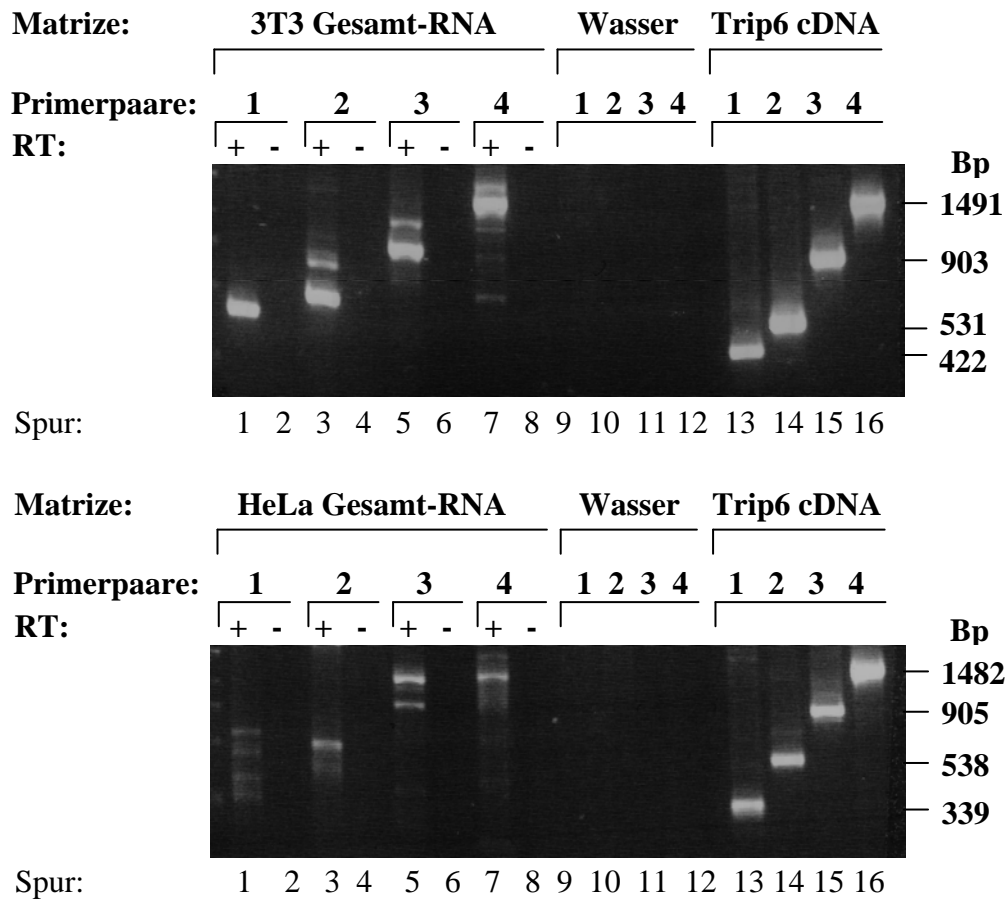
Die RT-Reaktionen wurden dann in einer PCR mit vier unterschiedlichen Trip6-Primerpaaren amplifiziert. Das Primerpaar eins amplifiziert Trip6-Sequenzen von der 5'-untranslatierten Region bis Exon drei, Primerpaar zwei bis Exon vier, Primerpaar drei bis Exon fünf und Primerpaar vier bis Exon neun (Vgl. Abb. 19 A).

Um einen Größenmarker für konventionell gespleißte Trip6-Sequenzen zu erhalten, wurde Trip6 cDNA voller Länge als Matrize in einer PCR-Reaktion mit den zuvor beschriebenen Primerpaaren verwendet. Zur Kontrolle einer eventuellen DNA-Kontamination, wurde zusätzlich eine PCR-Reaktion ohne Trip6 cDNA durchgeführt.

A)



B)



**Abb. 19: Trip6 Spleißvarianten können nur in 3T3 Zellen in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden**

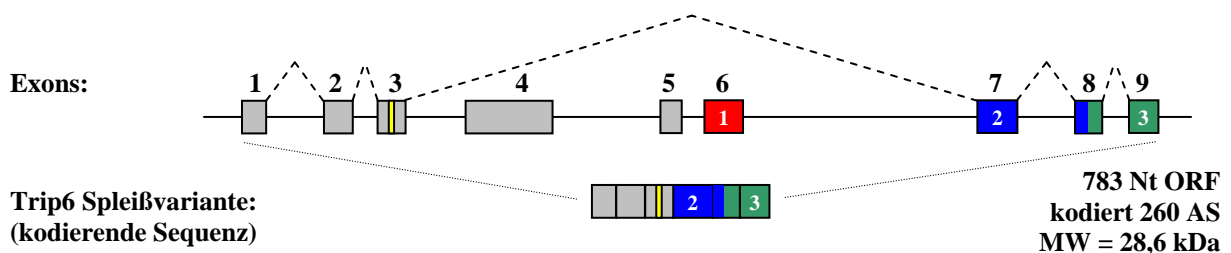
A) Schematische Darstellung der vier Trip6-Primerpaare und ihre komplementären Positionen zur Trip6 prä-mRNA. Paar eins amplifiziert von der 5'-untranslatierten Region (weißer Kasten) bis Exon drei, Paar zwei bis Exon vier, Paar drei bis Exon fünf und Paar vier bis Exon neun.

B) RT-PCR-Reaktion von 3T3 und HeLa Gesamt-RNA. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurden mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) transkribiert. Jeweils 1/10 der RT-Reaktionen wurden als Matrize in einer PCR-Reaktion mit den vier unterschiedlichen Trip6 spezifischen Primerpaaren verwendet. Als Größenmarker für konventionell gespleißte Trip6-Sequenzen wurden jeweils 50 ng Trip6 Vektor-cDNA als Matrize in einer PCR-Reaktion mit den vier Primerpaaren verwendet. Zur Kontrolle einer möglichen DNA-Kontamination, wurde in einer weiteren PCR Wasser als Matrize verwendet.

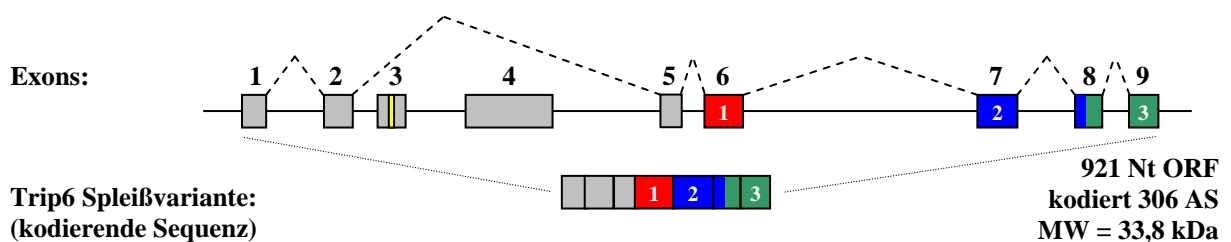
Die in Abbildung 19 B dargestellte PCR-Reaktion von Trip6 cDNA zeigt, dass mit jedem der vier Primerpaare jeweils eine Sequenz der erwarteten Basenpaarlänge amplifiziert wird. Die Kontroll-PCR-Reaktion zeigt, dass die Sequenzen ausschließlich von Trip6 cDNA amplifiziert wurden (Vgl. Spuren 13-16 mit 9-12). Daher können diese Amplifikate als Größenmarker für konventionell gespleißte Trip6-Sequenzen angesehen werden.

Das Ergebnis der RT-PCR von 3T3 und HeLa Gesamt-RNA zeigt, dass mit allen vier Primerpaaren jeweils ein Hauptprodukt amplifiziert wird, dass der Größe einer alternativ gespleißten Trip6-Sequenz entspricht (Vgl. Spuren 1, 3, 5, 7 mit 13, 14, 15, 16). Mit den ersten drei Primerpaarkombinationen können keine kleineren Produkte von 3T3 oder HeLa Gesamt-RNA amplifiziert werden (Spuren 1, 3, 5). Demzufolge ist alternatives Spleißen der Trip6 prä-mRNA im Bereich der ersten vier Exons unwahrscheinlich. Nur mit dem Primerpaar vier können sehr geringe Mengen drei kleinerer Produkte von 3T3 Gesamt-RNA, jedoch nicht von HeLa Gesamt-RNA, amplifiziert werden (Vgl. Spur 7). Die minus RT-Kontrolle zeigt, dass alle Sequenzen ausschließlich von Revers transkribierter Gesamt-RNA amplifiziert wurden (Spuren 2, 4, 6, 8). Daher könnte es sich bei den drei kürzeren Sequenzen in Spur 7 um Trip6 Spleißvarianten handeln. Um die exakte Sequenz dieser drei potentiellen Spleißvarianten zu ermitteln, wurden die Produkte eluiert, in Vektoren kloniert und dann sequenziert (Abb. 20).

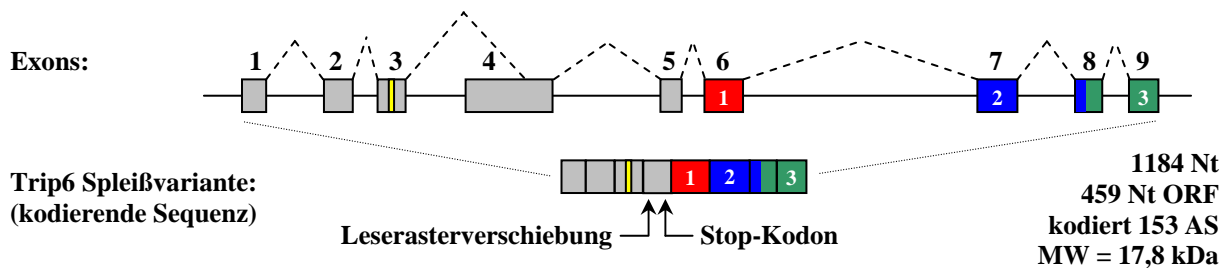
#### A) Trip6 Spleißvariante ohne Exons 4, 5 und 6



#### B) Trip6 Spleißvariante ohne Exons 3 und 4



### C) Trip6 Spleißvariante ohne die ersten 259 Nukleotide von Exon 4



#### Abb. 20: Die Trip6 Spleißvarianten können endogenes nTrip6 nicht kodieren

**A)** Trip6 Spleißvariante ohne Exons 4, 5 und 6: Das offene Leseraster (ORF) von 783 Nukleotiden (Nt) ist identisch mit den Trip6-Exonsequenzen 1, 2, 3, 7, 8 und 9. Es kodiert 260 Aminosäuren (AS) mit einem berechneten Molekulargewicht (MW) von 28,6 kDa.

**B)** Trip6 Spleißvariante ohne Exons 3 und 4: Das ORF von 921 Nt, ist identisch mit den Trip6-Exonsequenzen 1, 2, 5, 6, 7, 8 und 9. Es kodiert 306 AS mit einem berechneten MW von 33,6 kDa.

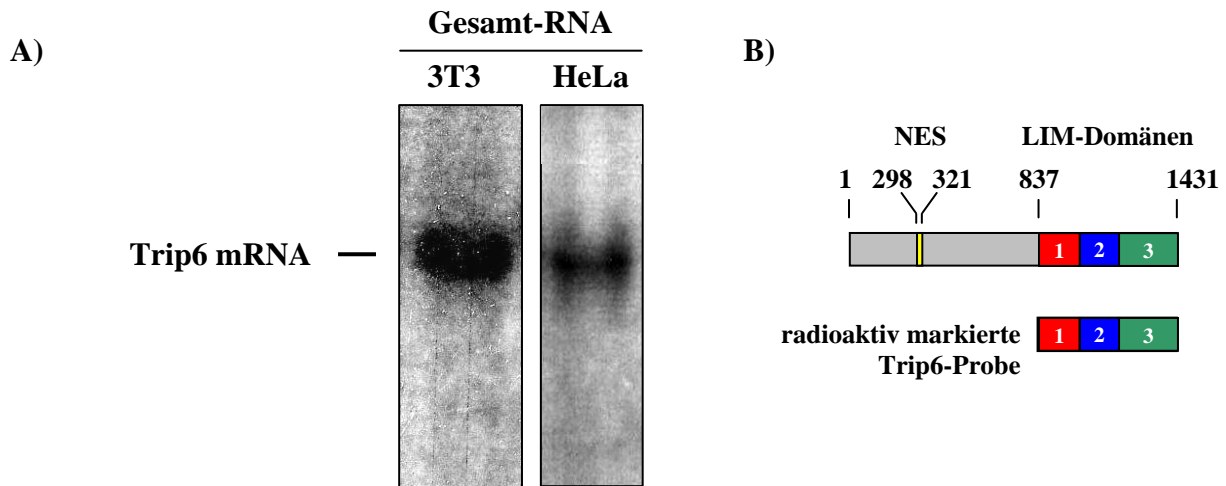
**C)** Trip6 Spleißvariante ohne die ersten 259 Nukleotide von Exon 4: Das Spleißen führt nach Nukleotid 363 zu einer Leserasterverschiebung der Trip6-Sequenz. Dadurch wird ein vorzeitiges Stop-Kodon nach Nukleotid 459 erkannt.

Alle drei Varianten kodieren daher nicht die Charakteristika von endogenem nTrip6.

Die Sequenzierung zeigte, dass die drei eluierten RT-PCR-Produkte durch alternatives Spleißen der Trip6-prä-mRNA entstanden sind. Das kleinste Produkt ist eine Spleißvariante bei der die Exons vier, fünf und sechs alternativ gespleißt sind. Sie entspricht jedoch nicht einer möglichen nTrip6 Spleißvariante, da ihr die kodierende Sequenz der LIM-Domäne eins fehlt. Darüber hinaus enthält sie die nukleäre Exportsequenz, was vermuten lässt, dass diese Variante eine zytoplasmatische Isoform kodiert (Abb. 20 A). Das größere RT-PCR-Produkt ist eine Spleißvariante mit 921 Nukleotiden, bei der die Exons drei und vier alternativ gespleißt sind. Da bei dieser Variante die nukleäre Exportsequenz gespleißt wurde, könnte sie eine nukleäre Isoform kodieren. Das berechnete Molekulargewicht dieser Isoform beträgt jedoch nur 33,8 kDa. Da endogenes nTrip6 ein Molekulargewicht von 40 kDa hat, kann diese Spleißvariante endogenes nTrip6 nicht kodieren (Abb. 20 B). Das größte eluierte RT-PCR-Produkt ist eine Spleißvariante, die durch alternatives Spleißen der ersten 259 Nukleotide von Exon vier entsteht. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung der Trip6 Sequenz. Daher kodiert auch diese Spleißvarianten nicht für nTrip6 (Abb. 20 C).

Dieses Ergebnis zeigt, dass keine der drei gefundenen Trip6 Spleißvarianten die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Charakteristika von endogenem nTrip6 kodiert.

Um das Ergebnis der RT-PCR-Reaktion durch eine andere Methode zu verifizieren und das quantitative Verhältnis zwischen Trip6 mRNA und den gefundenen Spleißvarianten zu bestimmen, wurde die Northern-Blot-Methode angewendet (Abb. 21). Hierfür wurde Gesamt-RNA von 3T3- und HeLa-Zellen extrahiert und die Trip6 mRNA mittels einer radioaktiv markierten Trip6-Probe der LIM-Domänen-Sequenz eins bis drei detektiert.



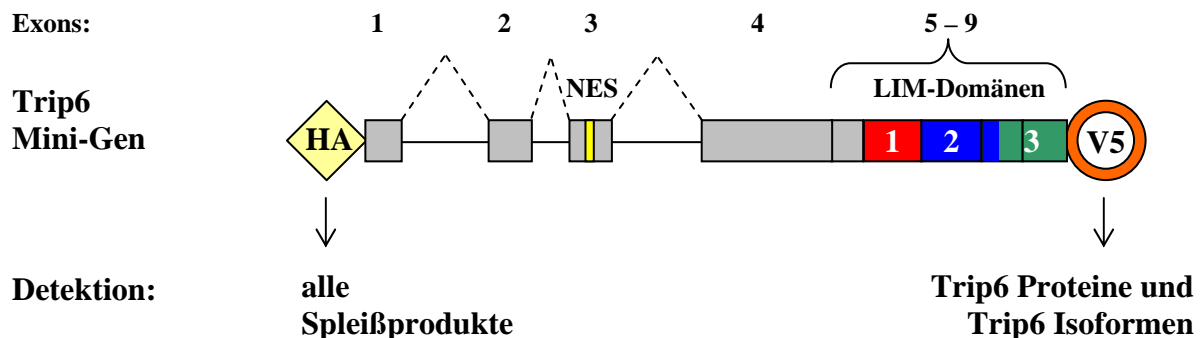
**Abb. 21: Trip6 Spleißvarianten kommen im Verhältnis zur Trip6 mRNA in sehr geringen Mengen vor**

A) Für die Detektion von Trip6 mRNAs wurden jeweils 20 µg 3T3 und HeLa Gesamt-RNA elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, durch Northern-Blot auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit einer radioaktiv markierten Probe der Trip6-Sequenz von Nukleotid 837 bis 1431 hybridisiert. Die Hybridisierung wurde durch exponieren der Membran gegen einen Röntgenfilm sichtbar gemacht. B) Schematische Darstellung der Hybridisierung von Trip6 mRNA (kodierende Sequenz) mit der Trip6-Probe.

Der Northern-Blot von 3T3 und HeLa Gesamt-RNA in Abbildung 21 zeigt, dass mit der radioaktiv markierten Trip6-Probe ausschließlich Trip6 mRNA voller Länge detektiert wird. Im Gegensatz zur RT-PCR von 3T3 Gesamt-RNA, können hier keine Trip6 Spleißvarianten detektiert werden (Vgl. Abb. 21 mit Abb. 19). Daher kommen die Trip6 Spleißvarianten im Vergleich zur Trip6 mRNA in nur sehr geringen Mengen vor. Dieses Ergebnis wurde auch schon bei der semiquantitativen RT-PCR von 3T3 Gesamt-RNA beobachtet (Vgl. Abb. 19).

Da die Menge der endogenen Spleißvarianten der limitierende Faktor für die Identifizierung potentieller nTrip6 Spleißvarianten ist, wurde die Konzentration der Spleißvarianten durch ektopische Überexpression eines *trip6* Genkonstrukts erhöht. Um hierbei ausschließlich Spleißvarianten zu untersuchen, welche die Charakteristika von endogenem nTrip6 kodieren, wurde ein Genkonstrukt kloniert, das Spleißen nur im Bereich der ersten vier Exons zulässt.

Dies wurde durch Fusion der genomischen *trip6* Sequenz von Exon eins bis vier, mit der kodierenden Trip6 Sequenz von Exon fünf bis neun, erreicht. Zusätzlich wurden passend zum Trip6 Leseraster eine aminoterminal HA-Sequenz und eine carboxyterminal V5-Sequenz für die spezifische Analyse der Expressionsprodukte des Konstrukts angefügt. Die aminoterminal HA-Sequenz dient der Detektion von konventionell und alternativ gespleißten Produkten und die carboxyterminale Sequenz dient der Überprüfung des korrekten Trip6 Leserasters der Produkte. Das genomische *trip6* Konstrukt wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Trip6 Mini-Gen bezeichnet (Abb. 22).



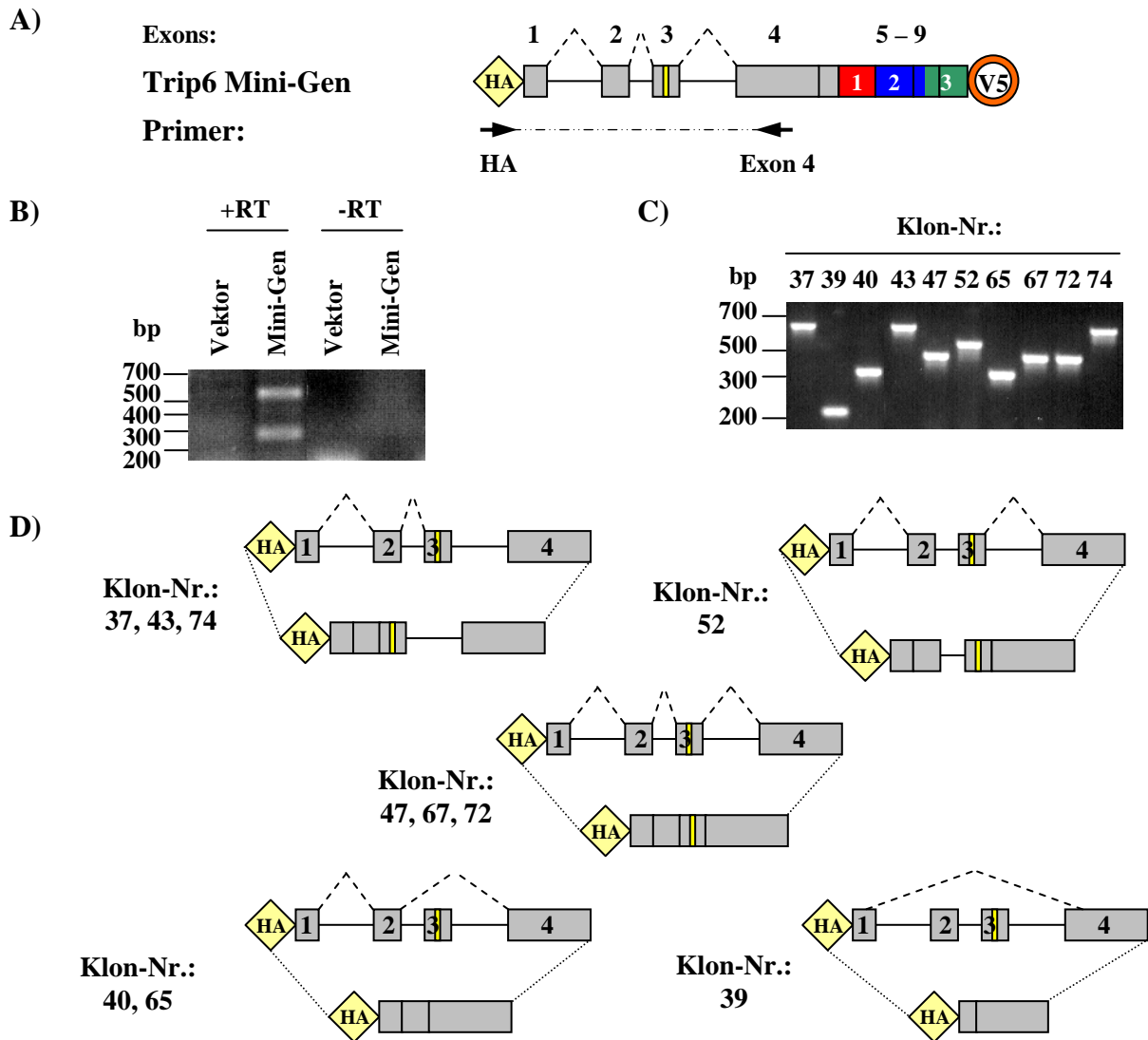
**Abb. 22: Schematische Darstellung des genomischen *trip6* Konstrukts (Trip6 Mini-Gen)**

Das Trip6 Mini-Gen besteht aus der murinen genomischen *trip6*-Sequenz von Exon eins bis vier und den kodierenden Exon-Sequenzen (ohne Introns) fünf bis neun. Daher ist konventionelles und alternatives Spleißen nur im Bereich der ersten vier Exons möglich. Dies gewährleistet, dass alle Varianten die drei LIM-Domänen enthalten. Darüber hinaus wird sichergestellt, dass diese Varianten nur Proteine kodieren, die ein Molekulargewicht von nicht weniger als 40 Kilo Dalton besitzen. Die aminoterminal HA-Sequenz kodiert ein Hämagglutinin-Epitop, wodurch alle Spleißprodukte spezifisch mit Antikörpern gegen dieses Epitop detektiert werden können. Die carboxyterminale V5-Sequenz kodiert ein V-Protein-Epitop des Paramyxovirus (SV5) von Affen. Mit Antikörper gegen das V5-Epitop können daher alle Proteine und Isoformen detektiert werden, die das Trip6 Leseraster besitzen.

Die Expression des Trip6 Mini-Gens wurde im gleichen Experiment auf RNA-Ebene durch die RT-PCR-Methode und auf Protein-Ebene durch Western-Blot-Methode untersucht (Abb. 23 und 24). Hierfür wurde das Mini-Gen transient in HeLa-Zellen transfiziert und die Gesamt-RNA, sowie die Gesamt-Proteine gewonnen.

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurde die Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in Gesamt-cDNA umgeschrieben und mit Primern, in der HA- und Exon vier Sequenz, amplifiziert. Die Gesamt-Amplifikate wurden dann durch das *pool*-Klonierungsverfahren in Vektoren ligiert. Die Größen der ligierten Trip6 Spleißvarianten wurde mittels PCR, mit Primern in der HA- und Exon vier Sequenz ermittelt und anschließend sequenziert (Abb. 23).





**Abb. 23: Das Trip6 Mini-Gen exprimiert konventionell gespleißte Trip6 mRNA und zwei unterschiedlich alternativ gespleißte Trip6 mRNAs**

**A)** Schematische Darstellung des Trip6 Mini-Gen und die komplementären Positionen des HA- und Exon 4-Primers **B)** RT-PCR von ektopisch exprimiertem Trip6 Mini-Gen.  $2 \times 10^6$  HeLa Zellen wurden mit je  $4 \mu\text{g}$  Trip6-Minigen-Vektor oder Leervektor durch die Lipofectamine-Methode transient transfiziert und 48 Stunden später geerntet. Je die Hälfte wurde für die Extraktion von Gesamt-RNA und für die Herstellung von Zelllysat verwendet. Das Zelllysat wurde für die Proteindetektion in Abbildung 24 verwendet. Jeweils  $1 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) transkribiert. 1/10 beider RT-Reaktionen wurden in einer PCR-Reaktion mit dem HA- und Exon 4-Primer verwendet. 1/50 der PCR-Reaktion wurde für das *pool*-Klonierungsverfahren verwendet und von dem Rest wurden die Amplifikate durch Agarose-Gelelektrophorese detektiert. **C)** Basenpaarlängen der Klone im Bereich der HA- und Exon 4-Sequenz. Nach dem *pool*-Klonierungsverfahren wurden positiv transformierte Klone durch die Kolonie-PCR-Methode mit dem HA- und Exon4-Primer identifiziert. Die Größen der Amplifikate wurden im Agarose-Gel mit einem Basenpaarmarker bestimmt. **D)** Schematische Darstellung des Spleißmusters der sequenzierten Klone. Nr. 37, 43, 74: Intronsequenz drei ist nicht gespleißt. Nr. 52: Intronsequenz zwei ist nicht gespleißt. Nr. 47, 67, 72: konventionell gespleißte Trip6-Sequenz. Nr. 40, 65: Exon drei ist alternativ gespleißt. Nr. 39: Ein Abschnitt von Exon eins und vier, sowie die Exons zwei und drei sind alternativ gespleißt.

Die RT-PCR-Reaktion mit Gesamt-RNA von Trip6 Mini-Gen transfizierten Zellen in Abbildung 23 B zeigt zwei Amplifikate der Größe von ungefähr 500 und 300 Basenpaaren. Diese werden nicht mit Gesamt-RNA von Leervektor transfizierten Zellen amplifiziert. Ebenso verhält es sich mit der minus RT-Kontrolle. Daher stammen die detektierten Amplifikate ausschließlich von Trip6 Mini-Gen transkribierter RNA.

Die *pool*-Klonierung dieser RT-PCR-Reaktion in Abbildung 23 C zeigt, dass mehr als nur die zwei zuvor detektierten Amplifikate in der RT-PCR-Reaktion vorhanden waren (Vgl. Abb. 23 B und C). Das *pool*-Klonierungsverfahren stellt daher eine sehr sensitive Methode für die Detektion von RT-PCR-Produkten dar.

Die Sequenzierung der einzelnen Produkte (Abb. 23 D) ergab, dass bei den Klonen 37, 43 und 74 das Intron drei, und bei dem Klon 52 das Intron zwei nicht gespleißt wurden. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um noch nicht vollständig gespleißte Trip6 Vorläufer-mRNAs.

Bei den Klonen 47, 67 und 72 wurden alle drei Introns konventionell gespleißt und ihre Sequenzen sind identisch mit der Trip6-Sequenz. Diese Klone sollten daher das zytosolische Trip6 Protein kodieren.

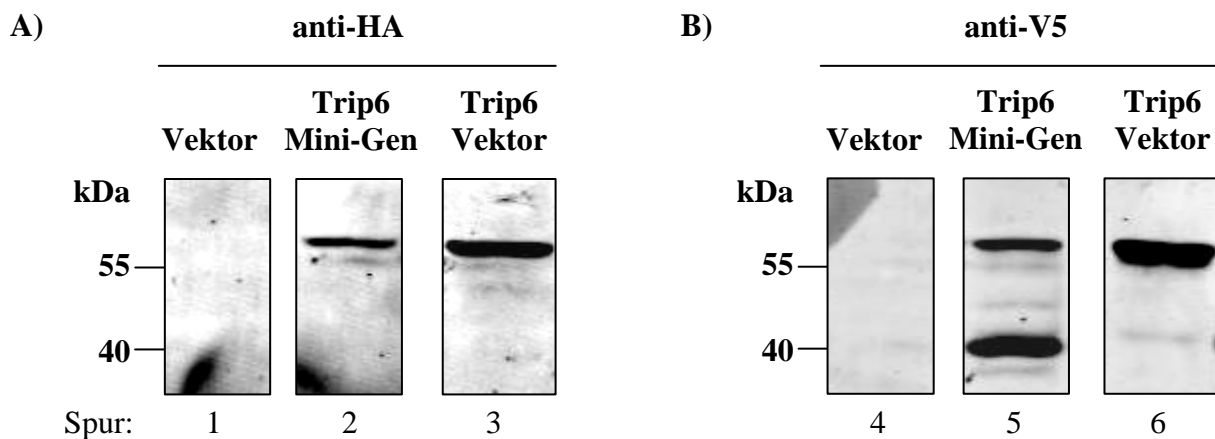
Bei den Klonen 40 und 65 wurde das Exon drei alternativ gespleißt, wodurch ihnen die nukleäre Exportsequenz fehlt. Eine solche Sequenz könnte eine nukleäre Trip6 Isoform mit einem berechneten Molekulargewicht von 46,4 kDa kodieren. Sie entspricht jedoch nicht dem Molekulargewicht von endogenem nTrip6 mit 40 kDa.

Der Klon 39 entsteht durch alternatives Spleißen der letzten 39 Nukleotide von Exon eins, zusammen mit Exon zwei und drei, sowie den ersten 54 Nukleotiden von Exon vier. Diese Sequenz besitzt ein durchgängiges offenes Leseraster und ihr fehlt die nukleäre Exportsequenz. Dieser Klon könnte eine nukleäre Trip6 Isoform mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 38,6 kDa kodieren. Dies würde den endogenen nTrip6 Charakteristika am Besten entsprechen.

Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass bei der Trip6 Mini-Gen-Expression, konventionell gespleißte Trip6 mRNA sowie unterschiedlich alternativ gespleißte Trip6 mRNAs entstehen. Alle mRNAs enthalten am 5'-Ende die HA-Epitop kodierende Sequenz (Abb. 23 D). Daher müssen ihre Translationsprodukte ein aminoterminales HA-Epitop besitzen.

Für die Untersuchung der Proteinexpression des Trip6 Mini-Gens wurden die in Abbildung 23 beschriebenen HeLa Zelllysate durch die Western-Blot-Methode untersucht (Abb. 24). Für die Detektion von Proteinen die durch konventionelles oder alternatives Spleißen entstehen, wurden Antikörper gegen ihr aminoterminal HA-Epitop verwendet. Um zu bestätigen, dass diese detektierten Proteine die korrekte Trip6 Aminosäuresequenz besitzen, wurden sie zusätzlich mit Antikörpern gegen ihr carboxyterminales V5-Epitop überprüft.

Als Größenkontrolle für das Trip6 Protein, wurde Zelllysate von HeLa Zellen verwendet, die mit einem Trip6-Expressionsvektor transfiziert wurden. Dieser Vektor besitzt die kodierende Trip6-Sequenz flankiert von den kodierenden Sequenzen für das aminoternale HA- und das carboxyterminale V5-Epitop.



**Abb. 24: Die Trip6-Isoform mit einem Molekulargewicht von 40 kDa wird nicht durch alternatives Spleißen gebildet**

Für die Detektion der Trip6 Mini-Gen Proteinexpression wurde das in Abbildung 23 beschriebene Zelllysate verwendet. Zusätzlich wurde Zelllysate von Trip6-Expressionsvektor transfizierten HeLa-Zellen benutzt, dass unter den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 23 beschrieben hergestellt wurde. Der Trip6-Expressionsvektor besteht aus der gleichen Sequenz wie das Trip6 Mini-Gen, außer den Intronsequenzen. Je 1/15 der Zelllysate wurden im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine durch Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern immunhybridisiert. **A)** Immunhybridisierung des Western-Blots mit Antikörpern gegen das HA-Epitop. **B)** Immunhybridisierung des Western-Blots mit Antikörpern gegen das V5-Epitop

Die Detektion der Trip6 Mini-Gen Proteinexpression in Abbildung 24 zeigt, dass nur ein Protein gebildet wird, das sowohl das aminoternale HA-Epitop als auch das carboxyterminale V5-Epitop besitzt (Vgl. Spur 2 und 5). Dieses Protein hat die gleiche Größe wie das Trip6 Protein des Expressionsvektors (Vgl. Spur 2 mit 3 und 5 mit 6). Daher handelt es sich bei diesem Protein um Trip6, dass durch Translation der in Abbildung 23 dargestellten konventionell gespleißten Trip6 mRNA entstanden ist. Außer diesem Trip6 Protein werden

keine weiteren kleineren Trip6-Isoformen detektiert, die das aminoternale HA-Epitop besitzen (Spur 2). Dieses Ergebnis zeigt, dass obwohl konventionell und alternativ gespleißte Trip6 mRNAs während der Trip6 Mini-Gen Expression gebildet werden, ausschließlich die konventionell gespleißte Trip6 mRNA translatiert wird (Vgl. Abb. 23 mit 24). Daher kann endogenes nTrip6 nicht durch alternatives Spleißen der Trip6 prä-mRNA im Bereich der ersten vier Exons gebildet werden.

Interessanterweise wird bei der Trip6 Mini-Gen Expression eine kleinere Trip6-Isoform mit 40 kDa detektiert, die das carboxyterminale V5-Epitop, aber nicht das aminoternale HA-Epitop besitzt (Vgl. Spur 2 mit 5). Da die in Abbildung 24 detektierten Trip6 Mini-Gen Spleißvarianten die kodierende HA-Sequenz enthalten, kann die 40 kDa Trip6-Isoform nicht durch Translation einer dieser Spleißvarianten entstanden sein.

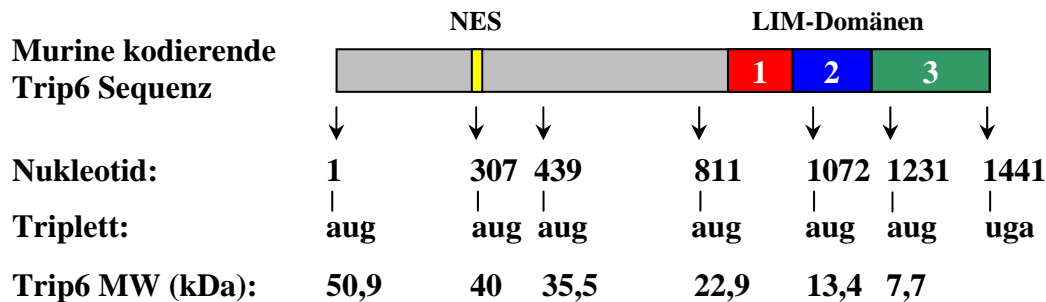
Bei der Trip6-Vektor Expression wird ebenfalls eine kleinere Trip6-Isoform mit 40 kDa detektiert, die das carboxyterminale V5-Epitop, aber nicht das aminoternale HA-Epitop besitzt (Vgl. Spur 3 mit 6). Da der Trip6-Vektor keine Intronsequenzen besitzt, kann diese Isoform ebenfalls nicht durch alternatives Spleißen entstanden sein. Sie wird jedoch sehr viel schwächer exprimiert, als die Isoform des Trip6 Mini-Gens (Vgl. Spur 5 mit 6). Daher begünstigt die genomische Trip6-Sequenz die Expression dieser Isoform.

Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Trip6 Mini-Gen und Trip6-Vektor Expression eine 40 kDa große Trip6-Isoform gebildet wird, welcher der aminoternale Abschnitt fehlt. Diese Isoform wird daher nicht durch alternatives Spleißen gebildet, sondern durch einen anderen molekularen Mechanismus, der auch für die Entstehung der endogenen nTrip6 Isoform verantwortlich sein könnte.

### **3.2.3 Die 40 kDa große Trip6-Isoform wird durch einen sekundären Translationsstart gebildet**

Die im vorhergehenden Kapitel gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass der endogenen nTrip6 Isoform der aminoternale Abschnitt fehlt. Daher sind zwei Mechanismen vorstellbar, die zur Bildung von nTrip6 führen. Eine Möglichkeit ist, dass eine Protease den Aminoternus des Trip6 Proteins abtrennt und so zur Bildung der 40 kDa großen nTrip6 Isoform führt. Die zweite Möglichkeit ist, dass ein zweiter Translationsstart in der kodierenden Sequenz von Trip6 existiert, von dem aus die nTrip6 Isoform translatiert wird.

Um beide Möglichkeiten zu überprüfen, wurde zunächst die Trip6-Sequenz auf sekundäre Translationsstarts hin untersucht (Abb. 25).



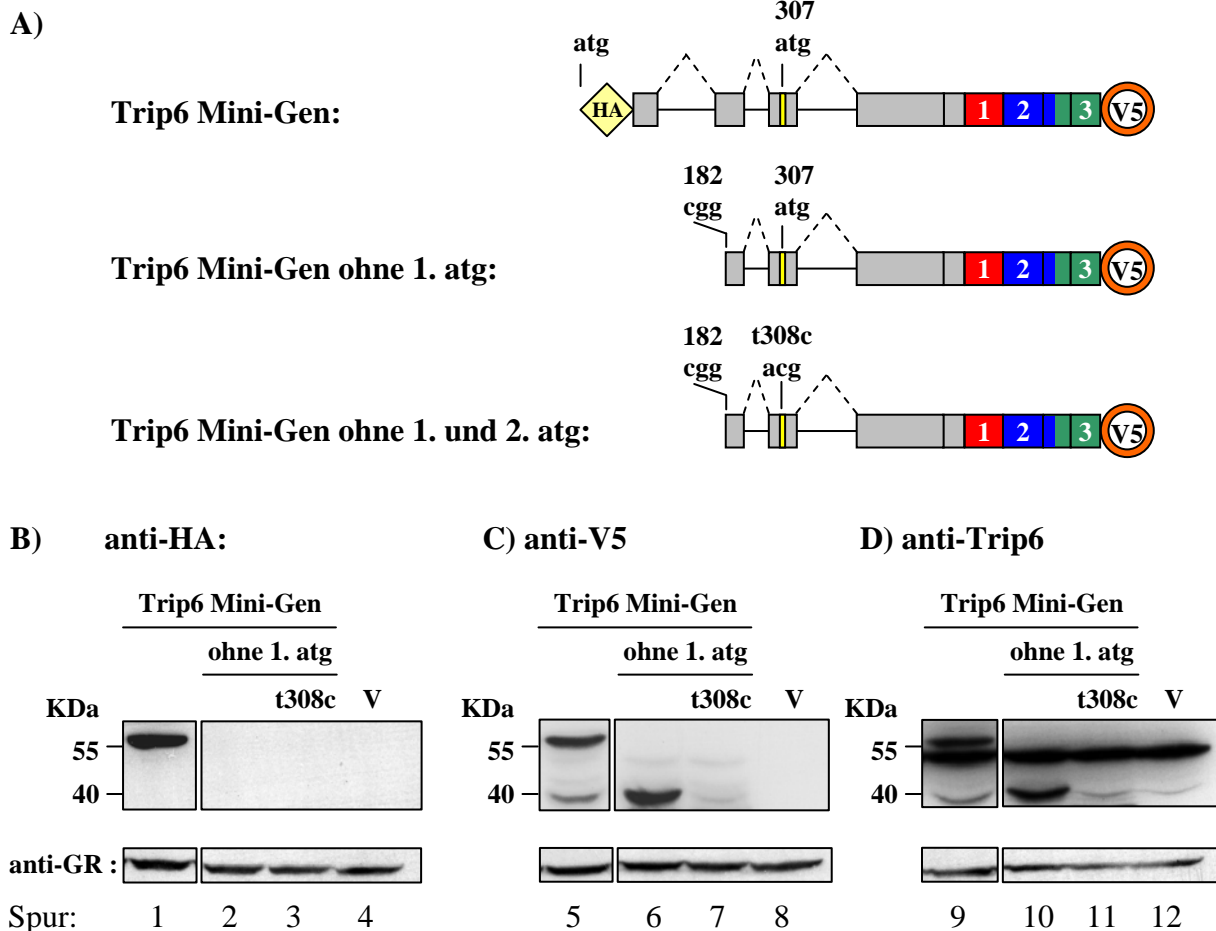
**Abb. 25: Schematische Darstellung möglicher sekundärer Translationsstarts der murinen kodierenden Trip6 Sequenz**

Neben dem primären Startkodon an Position 1, das für die Translation des 50,3 kD großen Trip6 Proteins genutzt wird (Wang et al., 1999), enthält die kodierende Sequenz der Trip6 mRNA fünf weitere potentielle sekundäre Startkodons. Jedoch nur die Translationsinitiation am sekundären Startkodon an Position 307, könnte zu einer Trip6 Isoform mit einem berechneten Molekulargewicht von 40 kDa führen.

Um festzustellen, ob ein sekundäres Startkodon für die Translation genutzt werden kann, wurde zunächst das primäre Startkodon im Trip6 Mini-Gen entfernt. Dadurch wird die Translation des Trip6 Proteins unterbunden, aber die Möglichkeit einer sekundären Translationsinitiation bleibt erhalten. Mit diesem Konstrukt kann daher klar zwischen der Isoform-Entstehung durch einen sekundären Translationsstart, oder einem proteolytischen Verdau des Trip6 Proteins unterschieden werden.

Um zu überprüfen, ob in diesem Konstrukt das sekundäre Startkodon an Position 307 genutzt wird, wurde es gegen das an der gleichen Position gelegene Threonin-kodierende-Triplett (acg) der humanen Trip6 Sequenz getauscht. Dadurch wird ein möglicher Translationsstart an Position 307 verhindert, während die Funktion des nukleären Exportsignals (NES) von Trip6 unbeeinflusst bleiben sollte (Abb. 26 A).

Die Expression der Konstrukte wurde mit der des unveränderten Trip6 Mini-Gens verglichen (Abb. 26). Hierfür wurden alle Konstrukte transient in HeLa Zellen transfiziert und die Proteinexpression durch die Western-Blot-Methode mit Antikörpern gegen das HA- und V5-Epitop, sowie gegen das Trip6 Epitop der kodierenden Exons drei und vier detektiert. Die Kontrolle von einheitlich verwendeten Proteinmengen erfolgte durch Immunhybridisierung mit Antikörpern gegen den Glukokortikoidrezeptor (GR).



**Abb. 26: Die Trip6-Isoform mit einem Molekulargewicht von 40 kDa wird durch sekundäre Translationsinitiation an Position 307 der murinen Trip6 mRNA gebildet.**

**A)** Schematische Darstellung der Trip6 Mini-Genkonstrukte.

Für die Detektion der Trip6 Mini-Gen Proteinexpression wurden  $2 \times 10^6$  HeLa Zellen mit jeweils 4  $\mu$ g der drei dargestellten Mini-Genkonstrukte (A) oder einem Leervektor (V) durch die Lipofectamine-Methode transient transfiziert und 48 Stunden später geerntet. Jeweils 1/20 der Zelllysate wurden im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine durch Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern immunhybridisiert. **B)** Immunhybridisierung mit Antikörpern gegen das HA-Epitop. **C)** Immunhybridisierung mit Antikörpern gegen das V5-Epitop **D)** Immunhybridisierung mit Antikörpern gegen das Epitop der kodierenden Trip6-Exonsequenzen drei und vier. Zur Kontrolle gleichmäßiger Proteinladung wurden Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor (GR) verwendet.

Die Kontroll-Immunhybridisierungen gegen das aminoternale HA- Epitop in Abbildung 26 A zeigt, dass ausschließlich das ektopisch exprimierte Trip6 Protein mit einer Größe von ungefähr 55 kDa gebildet wird (Spur 1). Durch die Immunhybridisierung gegen das carboxyterminale V5-Epitop wird die Expression von Trip6 und der 40 kDa Trip6-Isoform detektiert (Spur 5).

Die Deletion des ersten Startkodons im Trip6 Mini-Gen zeigt, dass die 40 kDa Trip6 Isoform immer noch gebildet werden kann, obwohl die Expression des Trip6 Proteins nicht mehr

vorhanden ist (Spur 6). Daher kann ausgeschlossen werden, dass die 40 kDa Trip6-Isoform durch einen Proteaseverdau des Trip6 Proteins gebildet wird.

Wird nun im aminoterminal-deletierten Konstrukt zusätzlich das zweite potentielle Startkodon durch die Punktmutation entfernt, geht auch die Expression der 40 kDa Trip6-Isoform verloren (Spur 7). Daher wird die ektopisch exprimierte 40 kDa Trip6-Isoform durch den sekundären Translationsstart an Position 307 der kodierenden Trip6 Sequenz gebildet (Abb. 26 B).

Die Immunhybridisierung mit dem Trip6 Antikörpern in Abbildung 26 C dient der Verifizierung der Ergebnisse in Abbildung 26 B. Das ektopisch exprimierte Trip6 Protein läuft aufgrund des HA- und V5-Epitop etwas langsamer im SDS-PAGE als das endogene Trip6 mit einem Molekulargewicht von 50,9 kDa (Spur 9).

Die durch das Mini-Gen exprimierte Trip6 Isoform migriert auf gleicher Höhe mit dem endogenen exprimierten nTrip6 bei 40 kDa (Vgl. 9 mit 12). Ohne das erste Startkodon des Mini-Gens werden nur noch endogenes Trip6 und die auf gleicher Höhe migrierenden Trip6-Isoformen der endogenen und ektopischen Expression detektiert (Spur 10). Nach der Mutation des zweiten Startkodons geht die ektopische Expression der Trip6 Isoform verloren, die Expression der endogenen nTrip6 Isoform wird aber noch detektiert (Vgl. Spur 11 mit 12).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die ektopisch exprimierte 40 kDa große Trip6-Isoform durch sekundäre Translationsinitiation an Position 307 der Trip6 mRNA gebildet wird. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Isoform genau wie endogenes nTrip6 im Nukleus lokalisiert ist.

### **3.2.4 Die Translationsinitiation am sekundären Startkodon ist verantwortlich für die nukleäre Lokalisation der 40 kDa Trip6-Isoform**

Die 40 kDa große Trip6-Isoform wird durch Translation am zweiten Startkodon der Trip6 kodierenden Sequenz gebildet (Abb. 26). Dieses Triplet kodiert die vierte Aminosäure der nukleären Exportsequenz von Trip6 (Wang und Gilmore 2001). Daher müssen der 40 kDa Trip6-Isoform die ersten drei Aminosäuren dieser Sequenz fehlen.

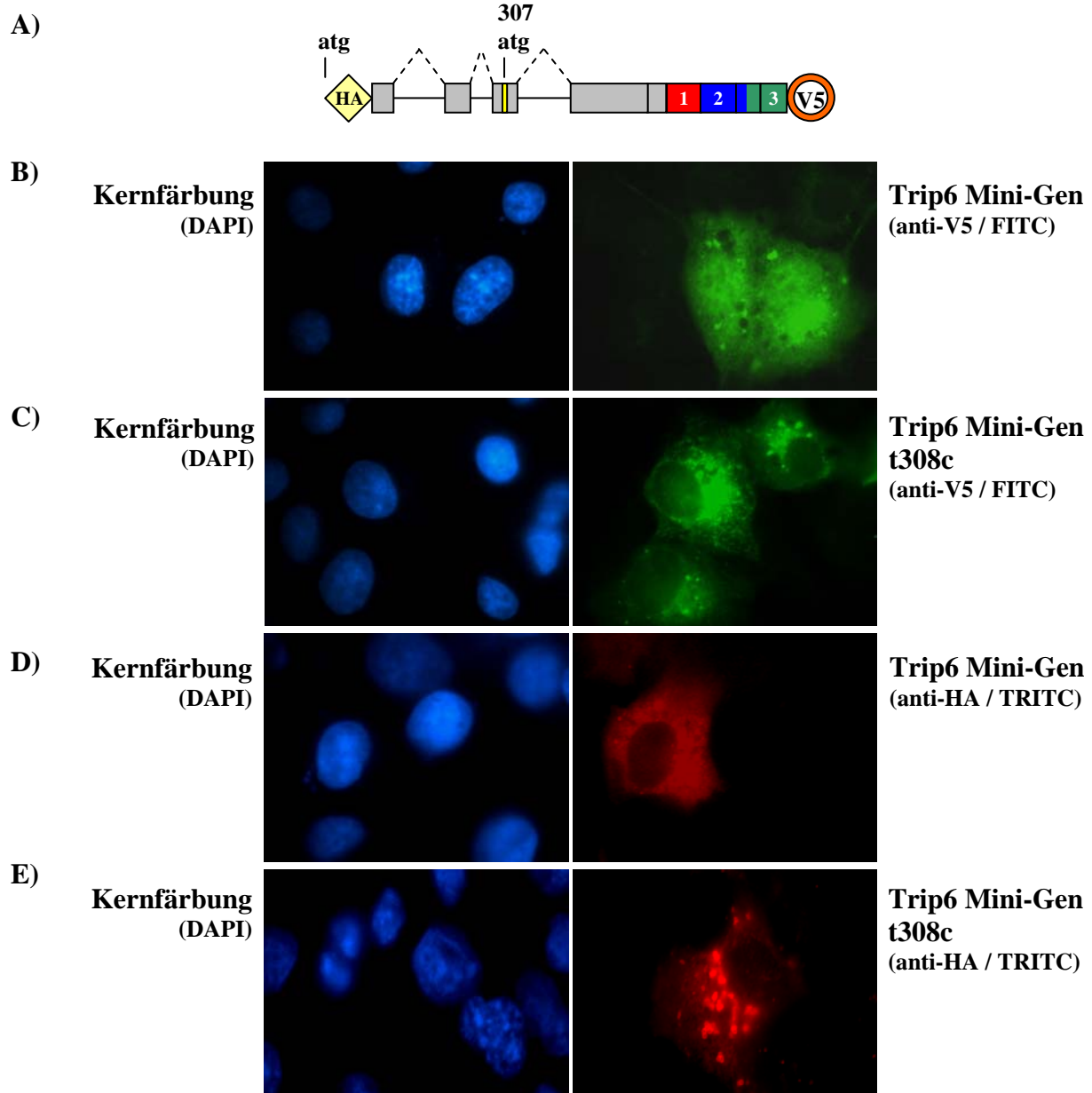
Die Sequenz des murinen nukleären Exportsignals besteht aus den Aminosäuren LTSMLADL. Es wurde gezeigt, dass die Deletion des aminoterminalen Abschnitts von Trip6 inklusive der nukleären Exportsequenz, oder die Punktmutation eines der drei konservierten Leucine im Exportsignal zur Akkumulation von Trip6 im Nukleus führt (Wang et al., 1999; Wang und Gilmore, 2001).

Es wäre daher möglich, dass die durch Translation vom sekundären Startkodon gebildete 40 kDa Trip6-Isoform, wie auch das endogene nTrip6 (Vgl. Abb. 16), ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Lokalisation der Trip6 Mini-Gen exprimierten Isoformen (Trip6 und seine 40 kDa Isoform) in Zellen durch Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 27).

Hierfür wurde in das Trip6 Mini-Gen voller Länge eine Punktmutation eingeführt, die das murine sekundäre Startkodon (atg) gegen das an der gleichen Position gelegene Threonin-kodierende Triplet (acg) der humanen Trip6 Sequenz tauscht. Dies verhindert die Translation der 40 kDa Trip6-Isoform wie es bereits in Abbildung 26 mit dem trunkierten Trip6 Mini-Gen gezeigt wurde.

Für die Untersuchung wurden das punktmutierte Trip6 Mini-Gen und das Wildtyp Mini-Gen transient in Cos-7 Zellen transfiziert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. Für die Detektion beider Trip6-Isoformen (Trip6 und seine 40 kDa Isoform) wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das carboxyterminale V5-Epitop immunhybridisiert. Zur Kontrolle der Lokalisation von Trip6 wurden transfizierte Zellen mit einem Antikörper gegen das aminoternale HA-Epitop immunhybridisiert. Anschließend wurden die detektierten Proteine durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte sekundäre Antikörper markiert. Für die Kernfärbung wurde blau fluoreszierendes DAPI verwendet. Die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Proteine wurde anschließend im Mikroskop bestimmt.





**Abb. 27: Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von Trip6 Mini-Gen exprimierten Proteinen**

A) Schematische Darstellung des Wildtyp Trip6 Mini-Gens

Für die Lokalisationsanalyse der Trip6 Mini-Gen exprimierten Proteine wurden  $1 \times 10^6$  Cos-7 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und durch die Lipofectamine-Methode mit jeweils 2 µg Wildtyp oder punktmutierten Trip6 Mini-Gen transient transfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Proteinexpression mit geeigneten Antikörpern detektiert:

B) Wildtyp und C) punktmutierte Trip6 Mini-Gen Expression. Die Immunhybridisierung erfolgte mit Antikörpern gegen das carboxyterminale V5-Epitop, die mit grün-fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde.

D) Wildtyp und E) punktmutierte Trip6 Mini-Gen Expression. Die Immunhybridisierung erfolgte mit Antikörpern gegen das aminoternale HA-Epitop, die mit rot-fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde.

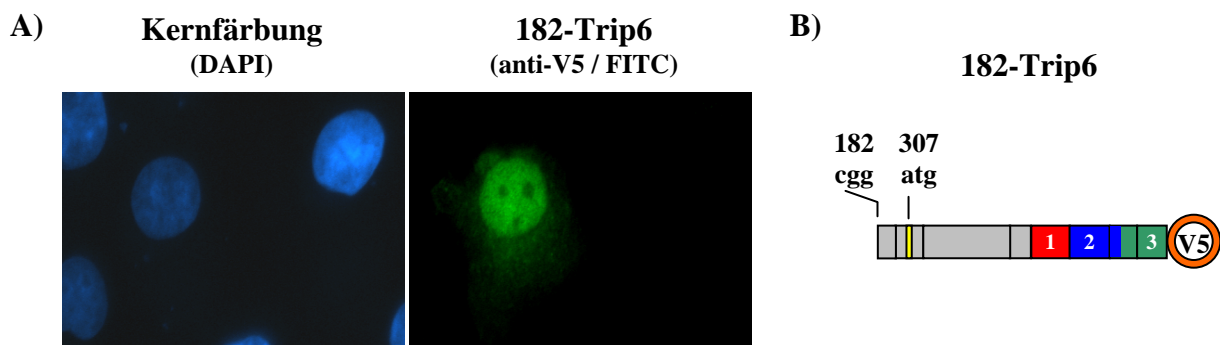
Für die Detektion der genomischen DNA im Kern, wurden alle transfizierten Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff DAPI inkubiert (linke Spalte, B bis E).

Die grüne Fluoreszenzmarkierung des V5-Epitops in Abbildung 27 B zeigt, dass die vom Wildtyp Trip6 Mini-Gen exprimierte Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zu finden sind. Dies entspricht der endogene *trip6*-Genexpression (Abb. 16). Nachdem das sekundäre Startkodon mutiert wurde, ist nahezu keine grüne Fluoreszenz mehr im Nukleus erkennbar (Abb. 27 C). Da Trip6 durch Translationsinitiation am primären und die Trip6-Isoform durch Initiation am sekundären Startkodon gebildet wird (Abb. 26), zeigt dieses Ergebnis, dass vermutlich nur die 40 kDa Trip6-Isoform eine nukleäre Lokalisation hat.

Die Detektion des rot fluoreszenzmarkierten HA-Epitops in Abbildung 27 D und C zeigt, dass die Expression des Wildtyp- oder mutierten Mini-Gens nur zur Färbung des Zytoplasmas führt. Dieses Ergebnis zeigt, dass vermutlich nur Trip6, welches durch Translationsinitiation vom ersten Startkodon gebildet wird (Abb. 26), eine zytoplasmatische Lokalisation hat. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass die Punktmutation an Position 308 der Trip6 kodierenden Sequenz keinen Einfluss auf die Funktion des nukleären Exportsignals von Trip6 hat.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Translationsinitiation vom primären Startkodon zur Produktion von zytoplasmatischem Trip6, und die Initiation vom sekundären Startkodon zur Translation einer 40 kDa nukleären Trip6-Isoform führt.

Um die nukleäre Lokalisation der 40 kDa Trip6-Isoform zu verifizieren, wurde ein Trip6-Konstrukt ohne primäres Startkodon kloniert. Es beginnt mit dem Nukleotid 182 der kodierenden Sequenz von murinem Trip6 und besitzt am 3'-Ende die kodierende Sequenz für das V5-Epitop. Für die Untersuchung der Lokalisation wurde, wie zuvor beschrieben, die Immunfluoreszenzmethode verwendet (Abb. 28).



**Abb. 28: Verifizierung der nukleären Lokalisation der Trip6-Isoform**

**A)** Um die nukleäre Lokalisation der Trip6-Isoform zu verifizieren wurden  $1 \times 10^6$  Cos-7 Zellen auf Deckgläsern ausgesät und durch die Lipofectamine-Methode mit  $2 \mu\text{g}$  des 182-Trip6-Konstrukts transient transfiziert. Die Immunhybridisierung erfolgte mit Antikörpern gegen das V5-Epitop, die dann mit grün fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde. Für die Detektion der genomischen DNA wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI inkubiert.

**B)** Schematische Darstellung des 182-Trip6-Konstrukts

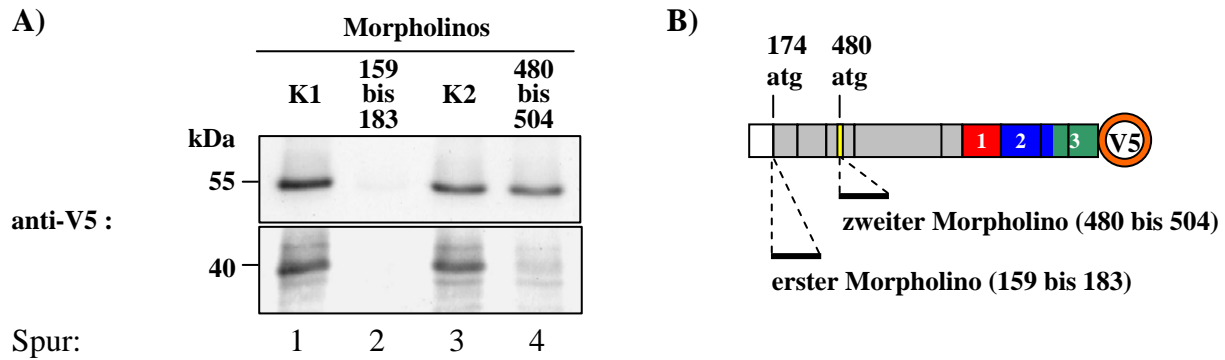
Die Detektion der Grünfluoreszenz in Abbildung 28 bestätigt, dass die 40 kDa Trip6-Isoform die durch Translationsinitiation vom zweiten Startkodon gebildet werden, eine ausschließlich nukleäre Lokalisation besitzen.

### **3.2.5 Endogenes nTrip6 wird durch sekundären Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA gebildet**

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die sekundäre Translationsinitiation an Position 307 der kodierenden Trip6 Sequenz eine 40 kDa Isoform produziert, die das gleiche Molekulargewicht und die gleiche exklusive nukleäre Lokalisation wie nTrip6 besitzt. Es wäre daher möglich, dass endogenes nTrip6 durch sekundäre Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA (= Position 307 der kodierenden Sequenz) gebildet wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Morpholinos verwendet. Morpholinos sind synthetisch hergestellte Antisenseoligonukleotide, die anstelle von Ribose- oder Desoxyribose-Ringen, Morpholinoringe neutraler Ladung enthalten. Sie binden spezifisch an komplementäre RNA-Sequenzen und blockieren sterisch die 5`-3` Progression der kleinen ribosomalen Untereinheit zum Startkodon (*scanning*), sowie die Bildung des großen Translationsinitiationskomplexes am Startkodon. Die Progression des großen ribosomalen Elongationskomplexes entlang der mRNA wird jedoch nicht durch Morpholinos blockiert. Ein weiterer Vorteil der Morpholinos ist, dass sie aufgrund des synthetischen Morpholinorings für keinerlei enzymatische Reaktionen der Zelle zugänglich sind (Summerton und Weller, 1997; Summerton, 1999). Daher können sie auch nicht die zelluläre RNA Interferenz-Antwort induzieren, die zum Abbau von doppelsträngigen RNA Molekülen führt (Sharp und Zamore, 2000).

Für den sterischen Block der Translationsinitiation von Trip6 am primären Startkodon der Trip6-mRNA (Position 174), wurde ein erster Morpholino im Sequenzbereich des primären Startkodons gewählt. Um eine mögliche Translationsinitiation für die endogene nTrip6 Isoform am sekundären Startkodon sterisch zu blockieren (Position 480), wurde ein zweiter Morpholino im Bereich des sekundären Startkodons gewählt (Abb. 29B).

Die Fähigkeit der Morpholinos die Translationsinitiation zu blockieren, wurde zunächst *in vitro* für die Translation eines Trip6-Expressionsplasmid getestet. Die translatierten Trip6-Isoformen (Trip6 und seine 40 kDa Isoform) wurden durch die Western-Blot-Methode mit Antikörpern gegen das carboxyterminale V5-Epitop detektiert (Abb. 29).



**Abb. 29: Die primäre und sekundäre Translationsinitiation kann mit Morpholinos *in vitro* spezifisch blockiert werden**

**A)** Western-Blot der *in vitro* Translation mit Retikulozytenlysat von jeweils 1 µg Trip6-Expressionsplasmid mit 5 µM Morpholinos (159 bis 183) oder (480 bis 504). Als Kontrolle wurden jeweils 5 µM Morpholinos (K1 und K2) der gleichen Positionen verwendet, die fünf nicht Trip6 mRNA komplementäre Nukleotide enthalten.

**B)** Schematische Darstellung des Trip6-Expressionsplasmids und der komplementären Positionen des ersten und zweiten Morpholinos zur Trip6 mRNA

(Nummerierung des Trip6-Expressionsplasmids = Nummerierung der murinen Trip6 mRNA NCBI Acc. Nr.: NM\_011639)

Der Western-Blot in Abbildung 29 A zeigt, dass die *in vitro* Translation von Trip6 und seiner 40 kDa Isoform nach Zugabe des ersten Morpholinos blockiert wird (Vgl. Spur 1 mit 2). Der zweiten Morpholino inhibiert nur die Translation der 40 kDa Isoform (Vgl. Spur 3 mit 4). Dieses Ergebnis zeigt, dass der erste Morpholino im Bereich des primären Startkodons die Translation von Trip6, als auch die der 40 kDa Isoform sterisch blockiert. Der zweite Morpholino im Bereich des sekundären Startkodons blockiert ausschließlich die Translation der 40 kDa Isoform, während Trip6 unverändert translatiert wird.

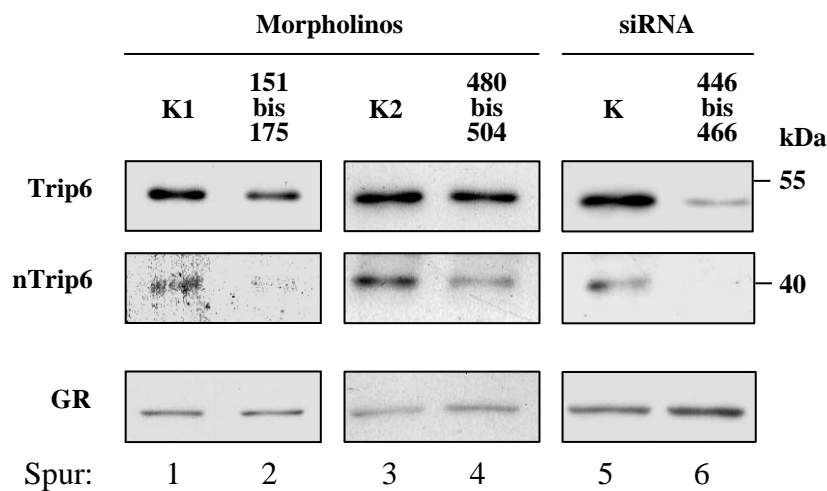
Die Blockierung der Translationsinitiation am primären Startkodon der Trip6 mRNA inhibiert auch die Translation der 40 kDa Trip6-Isoform. Es wäre daher möglich, dass der erste Morpholino die 5'-3'-Progression (*scannen*) der kleinen ribosomalen Untereinheit zum sekundären Startkodon sterisch blockiert und damit die Translation der 40 kDa Isoform verhindert. Dies lässt darauf schließen, dass die 40 kDa Isoform durch *leaky ribosomal scanning* (LRS) gebildet wird.

Um festzustellen, ob endogenes nTrip6 durch sekundäre Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA gebildet wird, wurden die Proteinmengen von endogenem Trip6 und nTrip6 nach sterischer Blockierung der primären bzw. sekundären Translationsinitiation untersucht. Um zu zeigen, dass es sich bei den detektierten Proteinen um Trip6 und nTrip6

handelt, wurde in einem zweiten Experiment die Trip6 mRNA Menge mittels Trip6-siRNA reduziert (Abb. 30).

Hierfür wurden 3T3 Zellen transient mit Morpholinos gegen den komplementären Bereich des primären (Position 174) und sekundären Startkodons (Position 480) der Trip6 mRNA transfiziert. Für den Kontrollansatz wurden 3T3 Zellen transient mit Trip6-siRNA komplementär zur Trip6 mRNA Sequenz 446 bis 466 transfiziert.

Die Gesamt-Proteine wurden durch die Western-Blot-Methode mit Antikörpern gegen ein Trip6 Epitop im Bereich von Exon drei und vier immunhybridisiert, womit Trip6 und nTrip6 detektiert werden sollte. Die Kontrolle einheitlich geladener Proteinmengen erfolgte durch Immunhybridisierung mit einem Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor (GR).



**Abb. 30: Endogenes nTrip6 wird durch sekundäre Translationsinitiation an Position 307 der murinen Trip6 mRNA gebildet**

Für die Analyse der Translationsinitiation von endogenem Trip6 und nTrip6 wurden  $7,5 \times 10^4$  3T3 Zellen mit jeweils 40  $\mu$ M Morpholinos (151 bis 175), (480 bis 504) oder Kontrollmorpholinos (K1 und K2) durch die *Endopore*-Methode transient transfiziert. Für die Reduzierung der endogenen Trip6 mRNA Menge wurden  $7,5 \times 10^4$  3T3 Zellen mit jeweils 20 pmol Trip6-siRNA (446 bis 466) oder DsRed-siRNA (K) durch die Lipofectamine-Methode transient transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach den Transfektionen lysiert. Für die Detektion der endogenen Trip6 und nTrip6 Proteinmengen wurden jeweils 1/20 der Zelllysate im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, durch die Western-Blot-Methode auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern gegen ein Trip6 Epitop der Exons drei und vier immunhybridisiert. Zur Kontrolle gleichmäßiger Proteinladung wurden Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor (GR) verwendet.

Das Ergebnis in Abbildung 30 zeigt, dass die Transfektion des ersten Morpholinos die Proteinmengen von Trip6 und nTrip6 reduziert (Vgl. Spur 1 mit 2). Daher wird durch die sterische Blockierung der primären Translationsinitiation an der Trip6 mRNA (139 bis 164), die endogene Proteinmenge von Trip6 als auch von nTrip6 reduziert.

Die Transfektion des zweiten Morpholinos verringert nur die Proteinmenge von nTrip6 (Vgl. Spur 3 mit 4). Da der zweite Morpholino die sekundäre Translationsinitiation am Startkodon 480 der Trip6 mRNA blockiert, wird endogenes nTrip6 durch Translationsinitiation an diesem sekundären Startkodon gebildet.

Die Transfektion der Trip6-siRNA zeigt, dass die Proteinmengen von Trip6 und nTrip6 stark reduziert werden (Vgl. Spur 5 mit 6). Dieses Ergebnis verifiziert, dass es sich bei den detektierten Proteinen der Größen 51 und 40 kD um *trip6* Genexpressionsprodukte handelt.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass endogenes nTrip6 durch sekundäre Translationsinitiation am Startkodon 480 der Trip6 mRNA gebildet wird. Da die sterische Blockierung der Translationsinitiation im Bereich des primären Startkodons durch den ersten Morpholino die Proteinmengen von Trip6 als auch von nTrip6 reduziert, wäre es möglich, dass nTrip6 durch *leaky ribosomal scanning* (LRS) gebildet wird. In diesem Fall muss die sekundäre Translationsinitiation von nTrip6 kappenabhängig sein (Kozak, 2002). Ein anderer Mechanismus der zur Translationsinitiation von nTrip6 an Position 480 führen könnte ist durch interne ribosomale Eingangsstellen (IRES) in der Trip6 mRNA. Die Translationsinitiation durch IRES ist jedoch kappenunabhängig (Hellen und Sarnow, 2001).

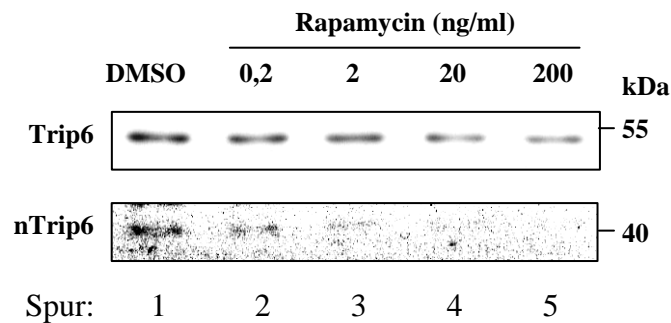
### **3.2.6 Endogenes nTrip6 wird durch kappenabhängige Translationsinitiation gebildet**

Während der mRNA-kappenabhängigen Translationsinitiation bindet zuerst die kleine ribosomale Untereinheit an den 5'-Kappenkomplex der mRNA und liest dann entlang der mRNA in 5'-3' Richtung bis zur Erkennung des Initiationskodons. An dieser Position kann sich jetzt der große Initiationskomplex bilden (Wickens et al., 2000).

Die sterische Blockierung der primären Translationsinitiation an der Trip6 mRNA durch den ersten Morpholino (151 bis 175) hat gezeigt, dass die Translation von Trip6 und nTrip6 inhibiert wird (Abb. 30). Da Morpholinos die 5'-3' Progression (*scannen*) der kleinen ribosomalen Untereinheit blockieren (Summerton und Weller, 1997; Summerton, 1999), wäre es möglich, dass nTrip6 durch mRNA-kappenabhängige Translationsinitiation gebildet wird. Hemmt man die kappenabhängige Initiation in Zellen mittels Rapamycin (Beretta et al., 1996), wäre daher zu erwarten, dass die Proteinmengen von Trip6 und nTrip6 im gleichen Verhältnis reduziert werden. Im Gegensatz dazu sollte im Fall einer Kappen-unabhängigen

Translationsinitiation von nTrip6 durch IRES, die nTrip6 Proteinmenge unabhängig von einer Behandlung mit Rapamycin sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in 3T3 Zellen die mRNA-kappenabhängige Translationsinitiation durch Rapamycin Behandlung steigender Dosis inhibiert und die Proteinmengen von Trip6 und nTrip6 durch die Western-Blot-Methode untersucht (Abb. 31).



**Abb. 31: Endogenes Trip6 und nTrip6 werden durch mRNA-kappenabhängige Translationsinitiation gebildet**

Für die Untersuchung einer möglichen mRNA-kappenabhängigen Translationsinitiation von endogenem nTrip6 wurde  $5 \times 10^4$  3T3 Zellen 48 Stunden das Serum entzogen. Dies ist erforderlich, da das Trip6 Protein eine Halbwertszeit von etwa 24 Stunden hat (Schneider, 2001 und Daten nicht gezeigt). Danach wurden die Zellen jeweils mit 0,2, 2, 20 und 200 ng Rapamycin pro Milliliter Zellkulturmedium behandelt. Für die unbehandelten Kontrollzellen wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet. Die Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet, die Gesamt-Proteine durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch die Western-Blot Methode auf eine Membran transferiert. Die Detektion der Trip6 und nTrip6 Proteinmengen erfolgte mit Antikörpern gegen ein Trip6 Epitop kodiert durch die Exons drei und/oder vier.

Der Western-Blot in Abbildung 31 zeigt, dass die endogenen Trip6 und nTrip6 Proteinmengen dosisabhängig mit steigender Rapamycin-Konzentration sinken. Daher werden Trip6 und nTrip6 durch mRNA-kappenabhängige Translationsinitiation gebildet.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bildung von nTrip6 durch interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) ausgeschlossen werden kann, da ihre Nutzung Kappen-unabhängig ist (Hellen und Sarnow, 2001). Des Weiteren lässt dieses Ergebnis vermuten, dass endogenes Trip6 und nTrip6 durch kappenabhängige-Translation der gleichen Trip6 mRNA gebildet werden. Die sekundäre Translationsinitiation von nTrip6 (Abb. 30) sollte daher durch *leaky ribosomal scanning* (LRS) vermittelt werden.

### **3.2.7 Sterische Blockierung der sekundären Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA inhibiert die transkriptionelle Aktivität von AP-1**

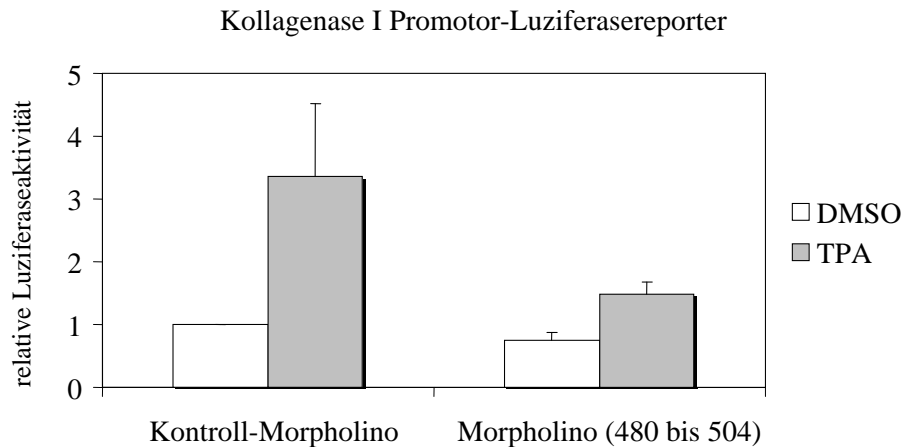
Trip6 und nTrip6 haben vermutlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation verschiedene Funktionen in der Zelle. Von zytosolischem Trip6 wurde gezeigt, dass es eine Rolle in der Zellmigration spielt (Cuppen et al., 2000; Xu et al., 2004; Lai et al., 2005; Takizawa et al., 2006). Das nTrip6 Protein hingegen ist ein Kofaktor von Transkriptionsfaktoren im Nukleus (Kassel et al., 2004).

Das endogene nTrip6 wird durch sekundäre Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA gebildet. Diese kann durch den Morpholino an Position 480 bis 504 der Trip6 mRNA sterisch blockiert werden, ohne die Translation von Trip6 zu beeinflussen (Abb. 30). Daher könnte dieser Morpholino als ein Werkzeug zur Untersuchung von nTrip6-spezifischen Funktionen eingesetzt werden. Diese Möglichkeit wurde am Beispiel der Koaktivator-ähnlichen Funktion von nTrip6 für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Kassel et al., 2004) überprüft.

Hierfür wurden 3T3 Zellen mit einem stabil transfizierten Reporterplasmid verwendet. Das Reporterplasmid enthält das *Firefly*-Luziferasegen, dessen Expression unter der Kontrolle des AP-1 regulierten Kollagenase I Promotors steht. Durch Behandlung der 3T3 Zellen mit dem Phorbolster TPA wird die AP-1 Aktivität induziert und kann als gesteigerte Luziferaseaktivität gemessen werden (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987).

Um den Einfluss der Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA auf die AP-1 Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem Kontroll-Morpholino oder dem Morpholino der komplementären Trip6 mRNA-Sequenz 480 bis 504 transient transfiziert. Danach wurde die AP-1 Aktivität durch TPA-Behandlung induziert und die Luziferaseaktivität gemessen (Abb. 32).





**Abb. 32: Sterische Blockierung der sekundären Translationsinitiation an Position 307 der Trip6 mRNA inhibiert die Aktivität von AP-1**

Zur Untersuchung der AP-1 Aktivität wurden  $7,5 \times 10^4$  Zellen der 3T3 Reporterzellen mit jeweils 40  $\mu\text{M}$  Morpholinos (480 bis 504) oder dem Kontroll-Morpholino (K2, Abb. 30) durch die *Endopore*-Methode transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 16 Stunden mit 50 ng / ml TPA (grau) oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO (weiß) behandelt. Danach erfolgte die Luziferaseaktivitäts-Messung im Luminometer. Die dargestellten Messwerte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Luziferaseaktivitäts-Messung in Abbildung 32 zeigt, dass die AP-1 Aktivität in Kontroll-Morpholino transfizierten Zellen nach TPA-Behandlung, um das 3,4-fache höher ist als in unbehandelten Zellen.

In Zellen die mit dem Morpholino der komplementären Trip6 mRNA-Sequenz 480 bis 504 transfiziert wurden, wird die AP-1 Aktivität durch TPA-Behandlung nur noch um das 1,5-fache induziert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die sterische Blockierung der sekundären Translationsinitiation von nTrip6 an Position 480 der Trip6 mRNA, die Koaktivator-Funktion von nTrip6 für den Transkriptionsfaktor AP-1 inhibiert werden kann. Da der zweite Morpholino (480 bis 504) die Translation von Trip6 nicht inhibiert (Abb. 30), lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die Koaktivator-Funktion für AP-1 nicht durch Trip6 sondern ausschließlich durch nTrip6 vermittelt wird. Daher kann die Morpholino-Methode für zukünftige Untersuchungen von nTrip6-vermittelten Funktionen verwendet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des Abschnitts 3.2, dass endogenes nTrip6 durch sekundäre Translationsinitiation an Position 480 der Trip6 mRNA gebildet wird. Die Translationsinitiation wird durch kappenabhängiges *leaky ribosomal scanning* vermittelt. Daher entspricht die nTrip6 Aminosäuresequenz den Aminosäuren 103 bis 481 des Trip6 Proteins.

## 4. Diskussion

Die LIM-Domänen-Proteine Trip6 und nTrip6 sind Protein-Isoformen der *trip6*-Genexpression, die in der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind (Kassel et al., 2004). Durch die individuelle intrazelluläre Verteilung kommen die beiden Proteine mit unterschiedlichen potentiellen Interaktionspartnern in Kontakt.

Die größere der beiden Isoformen, Trip6, ist im Zytoplasma mit Multi-Proteinkomplexen des Zytoskeletts und fokalen Adhäsionskontakten assoziiert. Mit Hilfe der LIM-Domänen vermittelt Trip6 spezifische Protein-Protein-Interaktionen, die bei der Regulation der Zellmigration, Adhäsion und Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen (Wang et al., 1999; Cuppen et al., 2000; Yi et al., 2002). Die kleinere Trip6-Isoform nTrip6 ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Als Bestandteil des Chromatins ist sie in der Lage, ebenfalls über die LIM-Domänen, mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren und kann deren Aktivität sowohl in positiver als auch in negativer Weise modulieren (Kassel et al., 2004; Heilbock, 2005). nTrip6 ist ein essentieller Koaktivator von Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF- $\kappa$ B-Familie. Die Fähigkeit von nTrip6, neben diesen Transkriptionsfaktoren auch mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) interagieren zu können, vermittelt darüber hinaus auch die negative Modulation der Aktivität von AP-1 und NF- $\kappa$ B (Kassel et al., 2004). Die nukleäre Trip6-Isoform ist daher ein bedeutender Koregulator von Transkriptionsfaktoren, die wichtige Funktionen bei der Organogenese, Tumorentstehung und Immunantwort übernehmen (Gosh et al., 1998; Jochum et al., 2001; Greten und Karin 2004; Wagner und Eferl, 2005).

Bisher gab es keine Möglichkeit, die Funktionen der beiden Trip6-Isoformen getrennt voneinander zu untersuchen, da bislang nicht bekannt war, wie das nukleäre Protein nTrip6 gebildet wird und welche Sequenz für nTrip6 kodiert. Ebenso sind die *in vivo* Funktionen von Trip6 und nTrip6 noch unbekannt.

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, den molekularen Mechanismus, der zur Bildung von nTrip6 führt, aufzuklären. Ausgehend von diesem Wissen war es möglich, die Expression von nTrip6 in spezifischer Weise zu inhibieren, ohne dabei die Synthese von Trip6 zu beeinflussen. Diese selektive Reduktion der nTrip6-Expression ermöglicht es, zukünftig die Funktionen von nTrip6 in der Zelle und im Organismus zu analysieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit ist es gelungen, einen entscheidenden Beitrag zur Generierung einer konditionellen *trip6*-defizienten Mauslinie zu leisten, die der Untersuchung von *in vivo*

Funktionen von Trip6 und nTrip6 dienen soll. Es wurde erfolgreich ein *trip6*-targeting Vektor kloniert, der mit hoher Effizienz den Wildtyp *trip6*-Genloкус durch homologe Rekombination ersetzt. Hierdurch wurden *trip6*-mutierte ES-Zellklone hergestellt, die für die Generierung einer konditionellen *trip6*-defizienten Mauslinie derzeit genutzt werden.

#### **4.1 Generierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Trip6 und nTrip6 vermittelten Funktionen *in vivo***

Alle Informationen die bisher über Trip6 und nTrip6 gesammelt wurden, stammen aus *in vitro* Zellkultursystemen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher eine *trip6*-defiziente Mauslinie zu generieren, welche erstmals die Untersuchung der wichtigen Trip6 und nTrip6 Funktionen *in vivo* ermöglicht.

Die Einbringung von spezifischen Modifikationen in das Mausgenom durch homologe Rekombination wird als *Gen-targeting* bezeichnet und ist eine Standardmethode für die Generierung von genetisch veränderten Mäusen, die der Untersuchung von Genfunktionen *in vivo* dienen.

Das *trip6*-Genprodukt nTrip6 ist ein essentieller Koaktivator für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1. Die Reduzierung der *trip6*-Genexpression durch siRNA inhibiert die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B und AP-1 (Kassel et al., 2004). Untersuchungen verschiedener NF- $\kappa$ B und AP-1-defizienter Mauslinien haben gezeigt, dass bestimmte Untereinheiten dieser Transkriptionsfaktoren für eine normale Embryonalentwicklung absolut erforderlich sind (Hilberg et al., 1993; Beg et al., 1995; Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000). Es wäre daher möglich, dass in einer *trip6*-defizienten Mauslinie die Aktivität von NF- $\kappa$ B und/oder AP-1 stark reduziert oder gar nicht vorhanden ist und diese Linie daher embryonal lethal sein könnte. Um dennoch die Auswirkungen des Verlusts des *trip6*-Gens auf den Organismus untersuchen zu können, wurde das *trip6 gene-targeting* so konzipiert, dass die *trip6*-Expression zelltypspezifisch oder zu einem bestimmten Zeitpunkt (konditionell) ausgeschaltet werden kann.

Das Cre/LoxP-System ist eine der am häufigsten verwendeten *gene-targeting* Methoden zur Etablierung einer konditionell gendefizienten Mauslinie (Behringer und Magnuson, 2002). In diesem System vermittelt die Rekombinase Cre die Deletion einer Sequenz, die von zwei LoxP-Sequenzen flankiert ist (Sternberg et al., 1981). Ein großer Vorteil hierbei ist, dass die

*cre*-Expression unter die Kontrolle induzierbarer oder gewebespezifisch aktiver Promotoren gestellt werden kann. Dies bietet zahlreiche Möglichkeiten der zeitlichen und örtlichen Exzision von LoxP-flankierten Sequenzen. Neben dem Cre/LoxP-System existiert das auf dem gleichen Prinzip basierende FLP/FRT-System. Die Cre-Rekombinase-Aktivität erreicht ein Optimum bei 37 °C, während die FLP-Rekombinase bei 30 °C liegt. Die Cre-vermittelte Exzision in Säugetieren ist daher effizienter als die der FLP-Rekombinase (Buchholz et al., 1996). Aus diesem Grund wurde für das *trip6 gene-targeting* das Cre/LoxP-System gewählt.

Das *gene-targeting* wird standardmäßig in pluripotente murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) durchgeführt. Hierbei wird Fremd-DNA, der so genannte *targeting*-Vektor, durch Transfektion in ES-Zellen eingebracht, woraufhin eine homologe Rekombination des *targeting*-Vektors mit der genomischen DNA möglich wird. Einige dieser mutierten ES-Zellen besitzen das Potential, sich zu Keimbahnzellen chimärer Mäuse zu differenzieren und können so zur Generierung homozygot mutierter Mauslinien beitragen (Thomas et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde erfolgreich ein *trip6 targeting*-Vektor kloniert, der den *trip6* Wildtyp-Genlocus in ES-Zellen durch homologe Rekombination ersetzt. Es wurden drei LoxP-Sequenzen und das positive Selektionsmarker-Gen Aminoglykosid-Phosphotransferase (*neo*) in ein Allel des *trip6* Genlocus inseriert. Das murine *trip6* Wildtypgen besteht aus neun Exons (Murthy et al., 1999). Die Exons zwei bis neun wurden von zwei LoxP-Sequenzen flankiert. Daran schließt sich direkt stromabwärts das *neo*-Gen an, gefolgt von der dritten LoxP-Sequenz. Dadurch wird sowohl der größte Teil von *trip6* als auch das *neo*-Gen durch LoxP-Sequenzen flankiert und kann anhand der Cre-Rekombinase konditionell deletiert werden.

Bei der Generierung einer konditionell gendefizienten Mauslinie muss darauf geachtet werden, dass nur das Zielgen mit Hilfe der Cre-Rekombinase-Aktivität ausgeschaltet wird und die Integrität des restlichen Genoms erhalten bleibt. Werden beim *gene-targeting* genregulatorische Sequenzen durch das *neo*-Gen ersetzt, kann dies zu einer Veränderung in der Expression der Gene führen, die unter der Kontrolle dieser Elemente stehen (Fiering, 1995). In dieser Arbeit diente das *neo*-Gen beim *trip6 gene-targeting* ausschließlich der positiven Selektion von rekombinierten ES-Zellen. Aus diesem Grund wurde die *neo*-Kassette durch Insertion in einen stromabwärts von der 3'-UTR des *trip6*-Gens gelegenen Bereich eingeführt. Da in diesem Bereich keine genregulatorischen Sequenzen bekannt sind, sollte weder die *trip6*-Genexpression, noch die Expression anderer Gene durch diese Insertion

beeinflusst werden. Die *in vitro neo*-Deletion in ES-Zellen sollte daher für die Generierung einer konditionell *trip6*-defizienten Mauslinie nicht zwingend erforderlich sein.

Ein weiteres essentielles Kriterium für die erfolgreiche Generierung genetisch veränderter Mauslinien ist das *gene-targeting* in keimbahngängigen ES-Zellen. Allgemeine Beobachtungen zeigen, dass nur ein bestimmter Anteil an Zellen einer ES-Zellpopulation in der Lage ist, sich zu Keimbahnzellen zu differenzieren. Es ist jedoch bislang nicht möglich, keimbahnkompetente ES-Zellen in Zellkultur anhand ihrer Morphologie, Karyotyps, *in vitro*-Differenzierung oder mit Hilfe von *in vitro*-Verfahren zu identifizieren. Ob eine ES-Zellpopulation keimbahngängige Zellen enthält, kann nur durch Generierung von chimären Mäusen und anschließender Verpaarung der Chimären mit Wildtyp Mäusen ermittelt werden (Torres und Kühn, 1997).

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche ES-Zelllinien, HM-1 und E14.1, für das *trip6 gene-targeting* verwendet. Es wurde berichtet, dass diese ES-Zelllinien einen hohen Anteil keimbahngängiger ES-Zellen besitzen. Darüber hinaus wurden diese ES-Zelllinien bereits mehrfach erfolgreich zur Generierung mutierter Mauslinien verwendet (Erwin Wagner, IMP Wien; Zhao-Qi Wang, FLI Jena).

Die durch das *trip6 gene-targeting* erhaltenen HM-1 ES-Zellklone trugen jedoch leider nicht zum Keimbahntransfer des mutierten *trip6*-Gens in den generierten chimären Mäuse bei, wie die Rückkreuzung mit Wildtyp Mäusen zeigte. Dies konnte bereits anhand des geringen Fellfarben-Chimärismus von etwa 20 % vermutet werden. Es ist jedoch unklar, warum die HM-1 ES-Zellklone ihre Pluripotenz verloren hatten. Eine Möglichkeit wäre, dass ein großer Teil der keimbahngängigen ES-Zellen durch das Passagieren der HM-1 ES-Zellen bzw. Klone entfernt wurde. Das *trip6 gene-targeting* wurde daher mit E14.1 ES-Zellen wiederholt. Wie zuvor in den HM-1 ES-Zellen konnte auch in den E14.1 ES-Zellen eine sehr hohe homologe Rekombinationseffizienz des *trip6 targeting*-Vektors mit dem *trip6* Wildtyp Genloкус nachgewiesen werden. Es muss jedoch noch verifiziert werden, ob in den rekombinierten E14.1 ES-Zellklonen das *trip6* Gen auch von der stromaufwärts gelegenen LoxP-Sequenz flankiert ist. Danach kann, wenn auch vermutlich nicht unbedingt erforderlich, das *neo*-Gen durch transiente Cre-Rekombinase Expression deletiert werden. Diese ES-Zellklone (E14.1*trip6*<sup>+/flox</sup>) können dann zur Etablierung einer homozygoten *trip6*<sup>flox/flox</sup> Mauslinie verwendet werden. Leider konnten diese Arbeitsschritte im Rahmen meiner Arbeit nicht fertig gestellt werden. Die von mir hergestellten E14.1*trip6+neo*<sup>+/flox</sup> ES-Zellen werden jedoch

zurzeit von unserer Arbeitsgruppe zur Generierung chimärer Mäuse bzw. konditionell *trip6*-defizienter Mäuse genutzt.

Bisher ist die *in vivo* Bedeutung von Trip6 und nTrip6 gänzlich unbekannt und kann anhand der bislang gewonnenen Erkenntnisse nur vermutet werden. Aufgrund der Rolle der nukleären Isoform nTrip6 als ein Kofaktor für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB ist denkbar, dass nTrip6 an der Regulation von biologischen Prozessen beteiligt ist, die durch diese Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Demzufolge könnte nTrip6 zelluläre Funktionen wie Apoptose, Zellproliferation und Differenzierung regulieren und damit bei der Modulation der Embryonal- und Organentwicklung oder der Immunantwort involviert sein. Durch Regulation der Zellmigration *in vivo* könnte auch Trip6 entwicklungsbiologische Relevanz besitzen oder einen Einfluss auf die Wanderung von Immunzellen sowie Zellen der Haut und des Bindegewebes haben. Es wäre daher von großem Interesse, die Rolle der beiden *trip6*-Proteinisoformen bei Erkrankungen infolge pathologischer Veränderungen dieser Prozesse, wie Krebs, Entzündungen, Wundheilungsstörungen und Dystrophien, zu studieren.

Die Verpaarung der homozygot *trip6<sup>flox/flox</sup>* Mauslinie mit zelltypspezifisch Cre-exprimierenden Mauslinien bietet zukünftig die Möglichkeit, den Verlust des *trip6*-Gens in bestimmten Zelltypen hervorzurufen und die Auswirkungen auf entsprechende Krankheitsbilder, wie zum Beispiel T-Zell-spezifische Hypersensitivitätsreaktionen, zu verfolgen. Darüber hinaus würde eine längerfristige Kreuzung *trip6*-defizienter Mäuse mit einer transgenen Mauslinie, bei der es zu einer verstärkten Tumor- und Metastasenbildung kommt, es erlauben, die Rolle der *trip6*-Expression bei den Mechanismen der Krebsentstehung und Metastasierung zu studieren.

Bei der konditionellen *trip6-knockout* Mauslinie wird beides, die Bildung von Trip6 und von nTrip6 ausgeschaltet sein. Die *in vivo* Funktionen der einzelnen Isoformen können somit nicht voneinander unterschieden werden. Eine Möglichkeit, dennoch Aussagen über die jeweiligen Funktionen machen zu können, wäre es, die *trip6-knockout* Maus mit nur einer der beiden *trip6*-Isoformen zu rekonstituieren. Um dies zu erreichen, ist es jedoch unbedingt erforderlich, den Mechanismus der Bildung von murinem nTrip6 zu kennen. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den molekularen Mechanismus der nTrip6 Bildung zu identifizieren.

## 4.2 Alternative Translationsinitiation und nicht alternatives Spleißen führt zur Bildung von nTrip6

Die durch Expression des *trip6*-Gens gebildeten Protein-Isoformen Trip6 und nTrip6 unterscheiden sich in ihrer Größe und intrazellulären Verteilung (Kassel et al, 2004). Das im Zytoplasma lokalisierte Trip6 hat ein Molekulargewicht von 50,9 kDa (Lee et al. 1995; Yi und Beckerle, 1998; Wang et al., 1999). Die kernspezifische Isoform nTrip6 ist kleiner als Trip6 und hat eine theoretische Größe von 40 kDa.

Protein-Protein-Interaktionsstudien und Promotorstudien haben gezeigt, dass die Trip6-Sequenz von Position 190 bis 476 ausreicht, um Interaktionen mit der AP-1-Untereinheit c-Fos und der NF-κB-Untereinheit p65 einzugehen und eine Aktivierung von AP-1- und NF-κB-regulierten Promotoren zu vermitteln (Kassel et al., 2004). Das Trip6<sup>190-476</sup>-Peptid besteht aus dem carboxyterminalen Bereich von Trip6 und enthält alle drei LIM-Domänen des Proteins, besitzt jedoch weder den Aminoterminalus noch das Kernexportsignal (NES) von Trip6. Da Trip6<sup>190-476</sup>, wie nTrip6 auch, ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Kassel et al., 2004 und unveröffentlichte Daten), wurde die Hypothese aufgestellt, dass aminoterminalen Bereiche bis zur Position 190 auch im nTrip6-Protein fehlen könnten, während der carboxyterminale Abschnitt nach dieser Position vorhanden sein muss.

In der *expressed sequence tags* (dbEST)-Datenbank des *National Centers for Biotechnology Information* (NCBI) sind unterschiedliche Trip6 ESTs enthalten, von denen einige vermuten lassen, dass die *trip6*-prä-mRNA durch alternatives Spleißen prozessiert werden kann (Boguski et al., 1993). Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob nTrip6 durch alternatives Spleißen der *trip6*-prä-mRNA gebildet werden könnte. In den von mir durchgeführten Expressionsstudien mit humanen epithelialen Zervixkarzinomzellen (HeLa) konnten jedoch keine Trip6-Spleißvarianten identifiziert werden. In Northern Blot- und RT-PCR-Analysen wurde ausschließlich das Trip6-Transkript nachgewiesen, welches durch konventionelles Spleißen der Trip6-prä-mRNA entsteht. Diese Beobachtung wird durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die in verschiedenen humanen Geweben und einer Lungenfibroblasten-Zelllinie (IMR-90) ebenfalls keine Trip6-Spleißvarianten identifizieren konnten (Lee et al., 1995; Murthy et al., 1999; Yi et al., 2002). Auch die mit murinen embryonalen Fibroblasten (3T3) durchgeführten Expressionsanalysen haben zu ähnlichen Ergebnissen geführt. Bei dieser Zelllinie konnten im Northern Blot-Verfahren ebenfalls keine zusätzlichen Trip6-Transkripte nachgewiesen werden. Allerdings wurden hier mit der vergleichsweise sensitiveren Methode, der RT-PCR, sehr geringe Mengen von alternativ

gespleißten *trip6*-mRNAs detektiert. Diese Transkripte kamen jedoch nicht als mögliche Kandidaten für eine nTrip6-kodierende mRNA in Betracht, da entweder LIM-Domänen-kodierende Exons alternativ gespleißt worden waren, Leserasterverschiebungen zu einem vorzeitigen Stop-Kodon führten oder die Größe der berechneten Proteins zu klein war, um nTrip6 zu entsprechen.

Obwohl es nicht möglich war, endogene Trip6-Spleißvarianten nachzuweisen, die als nTrip6-kodierende mRNA in Frage kommen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass ein solches Transkript gebildet wird, aber nur in sehr geringen Mengen vorliegt. Aus diesem Grund wurden Überexpressionsexperimente mit der genomischen prä-LIM-Domänen-Sequenz von Trip6 (sog. Trip6 Mini-Gen) durchgeführt, um so eine höhere Expression von murinen, alternativ gespleißten Trip6-Transkripten zu erreichen und eine Detektion dieser Produkte zu ermöglichen.

Durch die Expression des Trip6 Mini-Gens wurden neben der Trip6 mRNA auch zahlreiche alternativ gespleißte Transkripte gebildet, zu denen auch Genprodukte mit den vermuteten Charakteristika von nTrip6 gehören. Überraschenderweise wurde jedoch ausschließlich die konventionell gespleißte Trip6-mRNA und keine der Spleißvarianten zum Protein translatiert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die in der RT-PCR-Analyse detektierten Trip6-Spleißvarianten Produkte einer fehlerhaften RNA-Prozessierung sind und deshalb nicht translatiert werden. Eine solche Qualitätskontrolle während der mRNA-Prozessierung gewährleistet, dass ausschließlich korrekt gespleißte, reife mRNAs translatiert werden und die Bildung von mutierten und möglicherweise schädlichen Proteinen verhindert (Fasken und Corbett, 2005).

Ein Beispiel für die fehlerhafte Trip6 prä-mRNA Prozessierung ist die identifizierte Trip6-Spleißvariante mit einem vorzeitigen Stop-Kodon (*nonsense*-Kodon). Es ist seit langem bekannt, dass mRNAs mit vorzeitigen Stop-Kodons durch den so genannten *nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD)-Mechanismus erkannt und noch vor ihrer Translation abgebaut werden (Maquat, 2004). Dennoch lassen sich solche falsch prozessierten mRNAs durch sehr sensitive Methoden, wie der RT-PCR, nachweisen, obwohl sie nicht zur Bildung von Protein-Isoformen beitragen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die identifizierten Trip6-Spleißvarianten nicht translatiert werden und nur konventionelles Spleißen der Trip6-prä-mRNA zur Bildung einer translatierbaren mRNA führt. Demzufolge kann nTrip6 nur durch Translation der konventionell gespleißten Trip6-mRNA entstehen. Durch die



Expressionsanalyse des genomischen Trip6-Mini Gens konnte nachgewiesen werden, dass die Trip6-mRNA durch Initiation an zwei unterschiedliche Startkodons (AUG) translatiert wird. Die Translationsinitiation am ersten Startkodon führt zur Produktion von Trip6 mit zytosolischer Lokalisation. Die alternative Translationsinitiation am stromabwärts gelegenen sekundären AUG-Kodon bildet die nTrip6-Isoform mit ausschließlich nukleärer Lokalisation. Daher besitzt nTrip6 im Gegensatz zu Trip6 ein unvollständiges nicht funktionelles nukleäres Exportsignal und wird nicht wie Trip6 im Zytosol zurückgehalten.

Die Expression eines weiteren Konstrukts, welches nur die kodierende Trip6-Sequenz und somit keine Introns enthält, hat weiterhin gezeigt, dass beim Fehlen von intronischen Sequenzen die Translationseffizienz des sekundären stromabwärts gelegenen Startkodons herabgesetzt wird. Demnach haben die Introns in der Trip6-prä-mRNA einen verstärkenden Effekt auf die alternative Translationsinitiation an der reifen Trip6 mRNA. Die Translationseffizienz reifer mRNA hängt von zahlreichen RNA-bindenden Proteine so genannter mRNP Proteine (mRNA-Protein-Komplex Proteine) ab, die mit der reifen mRNA assoziiert sind. Die Rekrutierung von Spleiß-abhängigen mRNP Proteinen an die reife mRNA, insbesondere mRNP Proteine des Exon-Exon-Verbindungskomplexes, wird erst durch das Spleißen der prä-mRNA ermöglicht (Dreyfuss et al., 2002). Da bei der Expression der kodierenden Trip6-Sequenz kein Spleißen stattfindet, fehlen somit Spleiß-abhängige mRNP Proteine, welche die Translationseffizienz erhöhen können. Bei der Expression eines Konstrukts mit intronischen Sequenzen, wie dem Trip6 Mini-Gen, sind diese jedoch vorhanden und könnten somit Ursache für die vergleichsweise effizientere Translationsinitiation am sekundären Startkodon sein.

#### **4.2.1 Regulation der alternativen Translationsinitiation an der Trip6-mRNA**

Die am häufigsten beobachtete Form der Translation bei eukaryotischen Genen ist die sogenannte kappenabhängige Translationsinitiation. Der erste Schritt bei diesem Mechanismus ist die Bildung des Prä-Initiationskomplexes an der 5'-mRNA-Kappe. Die Rekrutierung des Prä-Initiationskomplexes ist ein regulierter Prozess, bei dem die Verfügbarkeit von freien eIF4E-Kappenbindeproteinen ein limitierender Faktor ist. In inaktiver Form ist eIF4E an das Protein 4E-BP gebunden und wird erst nach Phosphorylierung von 4E-BP durch die Kinase mTOR freigesetzt und somit aktiviert (Brown et al., 1994; Lawrence und Abraham, 1997). Die Aktivität von mTOR kann durch Rapamycin inhibiert werden, was zur Reduktion der kappenabhängigen Translationsinitiation führt

(Beretta et al., 1997). Die Proteinmenge von Trip6 und nTrip6 ist in Rapamycin-behandelten 3T3 Zellen herabgesetzt. Dies zeigt, dass die Translation von beiden Trip6-Proteinisoformen von der eIF4E-Aktivität abhängt. Die Translationsinitiation an der Trip6-mRNA findet somit sehr wahrscheinlich in 5'-mRNA-Kappen-vermittelter Weise statt.

Der allgemeine Mechanismus, wie Ribosomen ein Initiationskodon erkennen, ist der *scanning* Prozess (Kozak, 1978). Nach Bildung des Prä-Initiationskomplexes an der 5'-mRNA-Kappe, *scannt* der Komplex in 3'-Richtung, bis das erste Startkodon durch Basenpaarung erkannt wird (Kozak, 1999). Zusätzliche, weiter stromabwärts gelegene Initiationskodons können durch einen als *leaky ribosomal scanning* (LRS) bezeichneten Prozess genutzt werden. In diesem Fall *scannt* der Prä-Initiationskomplex über das erste Startkodon hinweg und initiiert die Translation am nächsten, stromabwärts gelegenen Startkodon (Kozak, 2002). Mit Hilfe von Mutagenese-Experimenten konnte das Kodon an Position 480 der Trip6-mRNA als Startkodon für die Translationsinitiation, die zur Bildung von nTrip6 führt, identifiziert werden. Die Blockierung dieser Initiationsstelle mittels Morpholino-Oligonukleotiden führte zu einer Repression der nTrip6-Translation. Die Translation von Trip6, die am Startkodon 174 initiiert wird (Yi und Beckerle, 1998; Wang et al., 1999), blieb dabei unbeeinflusst. Eine Inhibition der Translationsinitiation am Startkodon 174 hingegen reduzierte nicht nur die Synthese von Trip6 sondern auch die von nTrip6. Demzufolge entstehen Trip6 und nTrip6 durch Translation der gleichen mRNA, wobei nTrip6 durch alternative Translationsinitiation an Startkodon 480 durch LRS gebildet wird.

Bei vielen eukaryotischen mRNAs wird ausschließlich das erste 5'-proximalen AUG Startkodon genutzt, wenn es in der optimalen Konsensussequenz **CCRCCAAUGG** (Das A des unterstrichenen Startkodons ist als +1 definiert; Kozak, 1989) liegt. Die am stärksten konservierten Nukleotide sind **R** (A oder G) bei -3 und **G** bei +3 (Kozak, 1981, 1984, 1986). Die Effizienz der Translationsinitiation hängt von den Positionen -3 und +3 ab. Die Abweichung beider Positionen von der optimalen Konsensussequenz führt zu starken LRS und die Abweichung einer dieser Positionen vermittelt schwaches LRS (Smith et al., 2005). Das 5'-proximale Startkodon der Trip6 mRNA liegt in der Sequenz AGACCAUGT, bei der die +3 Position nicht der optimalen Konsensussequenz entspricht. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die +3 Position für das schwache LRS und die Produktion von nTrip6 mit verantwortlich ist.

Bisher ist es nicht bekannt, ob das Mengenverhältnis zwischen Trip6 und nTrip6 unter bestimmten Bedingungen reguliert wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Translationseffizienz am alternativen Startkodon drastisch erhöht, wenn das 5'-proximale Startkodon im ektopisch exprimierten Trip6 Mini-Gen fehlt. In der Zelle könnte diese Situation durch erhöhtes LRS an der Trip6 mRNA erreicht werden, was zur erhöhten Translation von nTrip6 führt. In diesem Fall würde die Trip6 mRNA der Gen-spezifischen Translationskontrolle unterliegen, wie sie beispielsweise bei der C/EBP mRNA beschrieben wurde (Calkhoven et al., 2000). Wie bei der *trip6*-Expression entstehen bei der Expression von *c/ebp* zwei funktionelle Protein-Isoformen durch Translationsinitiation an zwei verschiedenen Startkodons der gleichen mRNA. Hierbei findet ebenfalls LRS statt (Ossipow et al., 1993; Calkhoven et al., 2000). Welche dieser Startkodons genutzt wird, ist abhängig von der Aktivität des Kappenbindepoteins eIF4E und der eIF2-Untereinheit des ternären Komplexes. Eine geringe eIF4E- und eIF2-Aktivität führt zur vermehrten Translation der CEB/P Isoform voller Länge, während gesteigerte eIF4 und eIF2 Aktivität die Translation der aminoterminal trunkierten CEB/P Isoform vom alternativen Startkodon erhöht. Die Kontrolle der CEB/P Isoformen Expression wird durch ein cis-regulatorisches Element in der 5'-UTR, dem *upstream open reading frame* (uORF) vermittelt (Calkhoven et al., 2000). Die Trip6-mRNA besitzt ebenfalls ein uORF in der 5'-UTR (118 bis 138). Aufgrund dieser zahlreichen Parallelen zwischen der Expression von CEB/P und Trip6, wäre es möglich, dass die Translation der Trip6-mRNA in ähnlicher Weise reguliert wird. Um dies zu überprüfen sollte der Einfluss des Trip6 uORF auf die Translation der beiden Isoformen untersucht werden.

#### **4.2.2 Bedeutung einer translationellen Kontrolle der Trip6 mRNA**

Die Kontrolle der Proteinsynthese wird in zwei Mechanismen eingeteilt. Der erste Mechanismus ist die allgemeine Kontrolle, in der die Translation der meisten mRNAs durch Hormon- oder Wachstumsfaktoren erhöht wird. Der zweite Mechanismus betrifft eine kleinere Gruppe von mRNAs, deren Translationskontrolle von cis-regulatorischen Elementen, wie beispielsweise den uORFs vermittelt wird (Dever, 2002). Nur etwa 10 % der Vertebraten mRNAs können in dieser Weise reguliert werden, von denen die meisten Transkripte für Wachstumsfaktoren, Zytokine, Komponenten des Zellzyklus und Proto-Onkogene kodieren (Kozak, 1991). Beispiele für Proteine die auf translationeller Ebene reguliert werden sind die Zellzyklus-regulierenden Proteine p27 und Cyclin D1, der Wachstumsfaktor Thrombopoetin, der Apoptoseregulator BCL-2 und die Transkriptionsfaktoren ATF-4 und CEB/P (Hengst und Reed, 1996; Rousseau et al., 1996 (a und b); Ghilardi et al., 1998; Harigai et al., 1996;

Harding et al., 2000; Calkhoven et al., 2000). Diese Proteine spiegeln die Bedeutung der translationellen Kontrolle für das Zellwachstum, die Differenzierung und Proliferation wieder. nTrip6 ist ein wichtiger Koaktivator des Transkriptionsfaktors AP-1, der in der Entwicklung, im Immunsystem, bei Entzündungsreaktionen und der Tumorentstehung essentielle Funktionen übernimmt (Gosh et al., 1998; Jochum et al., 2001; Greten und Karin 2004; Kassel et al., 2004; Wagner und Eferl, 2005). Die stark tumorpromovierende Agens TPA induziert die Aktivität von AP-1 (Nishizuka, 1984; Angel und Karin, 1991). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Inhibition der alternativen Translationsinitiation von nTrip6 die TPA-induzierbare AP-1 Aktivität reduziert wird. Die Überexpression von Trip6<sup>190-476</sup> erhöht die AP-1 Aktivität (Kassel et al., 2004). Eine mögliche translationelle Kontrolle der nTrip6 Proteinsynthese, muss daher einen Einfluss auf die AP-1 Aktivität haben und könnte hierbei eine Rolle für die AP-1 vermittelten Funktionen spielen.

Die Verfügbarkeit des Kappenbindeprotein eIF4E ist ein limitierender Schritt für die kappenabhängige Translationsinitiation an mRNAs (Gingras et al., 1999). Die Überexpression von eIF4E induziert eine maligne Transformation von 3T3 Fibroblasten (Lazaris-Karatzas et al., 1990). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in mehreren Krebsarten, wie Kolon- und Brustkarzinomas, non-Hodgkin's Lymphomas und primären Blasenkrebsarten die freie Verfügbarkeit von eIF4E erhöht ist (Dua et al., 2001). Wachstumsfaktoren induzieren die Aktivität von eIF4E durch zwei Mechanismen. Zum einen erhöhen die Wachstumsfaktoren die mRNA als auch die Proteinkonzentration von eIF4E (Morris, 1995; Rosenwald, 1996). Im zweiten Mechanismus führt die Phosphorylierung der eIF4E Bindeproteine (4E-BP) zur Freisetzung von eIF4E aus dem inaktiven Komplex mit 4E-BP (Rhoads et al., 1994). Es ist mittlerweile Anerkannt, dass die fehlerhafte Regulation von eIF4E zur gesteigerten Translation von mRNAs mit cis-regulatorischen Elementen in der 5'-UTR führt (Benedetti und Graff, 2004). Wie bereits oben erwähnt kodieren diese mRNAs für Proteine, die insbesondere für die Regulation der Zellproliferation zuständig sind.

Die erhöhte Aktivität von eIF4E in Tumorgeweben könnte ebenfalls zur gesteigerten alternativen Translation von nTrip6 führen, wie es für die aminoterminal trunkierte Isoform des Transkriptionsfaktors CEB/P vermutet wird (Calkhoven et al., 2002). Die hierdurch erhöhte nTrip6 Proteinmenge könnte so die AP-1 abhängige Zellproliferation erhöhen und somit zur Transformation von Zellen beitragen. Es wäre daher sehr interessant das Mengenverhältnis der Trip6 Isoformen in unterschiedlichen Tumorgeweben mit erhöhtem eIF4E Proteinkonzentration zu untersuchen. Eine erhöhte nTrip6 Proteinmenge in diesen

Gewebe könnte auf eine AP-1 abhängige Transformation hindeuten. Gleichzeitig könnte an diesen Geweben die Translationsregulation von nTrip6 untersucht werden.

#### **4.3 Ausblick: Trip6 und nTrip6 vermittelte Funktionen können differenziert untersucht werden**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Bildung von nTrip6 und Trip6 könnten zusammen mit einer erfolgreichen Generierung der konditionellen *trip6*-knockout Mauslinie zukünftig genutzt werden, um die jeweiligen Funktionen der einzelnen Trip6-Isoformen zu analysieren.

Zum einen könnte aus einer Rekonstitution von *trip6*-defizienten Zellen mit Trip6 oder nTrip6 mittels Expressionsvektoren *in vitro* Rückschlüsse gezogen werden, welche der Trip6 Isoformen für einen möglichen Phänotyp der *trip6*-defizienten Mäuse verantwortlich ist. Bei der Wiederherstellung der Trip6-Expression muss jedoch beachtet werden, dass die alternative Translationsinitiation, die zur Bildung von nTrip6 führt, durch das Trip6-Konstrukt nicht möglich ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann dies beispielsweise durch Austausch von Thymidin 481 durch Cytosin erfolgen. Diese Mutation inhibiert die alternative Translationsinitiation an der Trip6-mRNA. Eine weitere Strategie, die zur Inaktivierung der alternativen Translationsinitiation an der Trip6-mRNA genutzt werden kann, ist die Inhibition des *leaky ribosomal scanning* (LRS)-Mechanismus. Bei vielen eukaryotischen mRNAs wird ausschließlich das erste 5'-proximale AUG Startkodon zur Translationsinitiation genutzt, wenn es in einer optimalen Konsensussequenz liegt (Kozak, 1989). Daher könnte durch Optimierung der Sequenz, in der das 5'-proximale, Trip6-spezifische Startkodon liegt, sowohl das LRS als auch die alternative Translation von nTrip6 inhibiert werden.

Für eine zukünftige differenzierte Untersuchung der Trip6-Isoformen *in vivo*, können konditionell *trip6*-defiziente Mäuse genutzt werden, indem sie entweder nur durch Trip6 oder nur durch nTrip6 rekonstituiert werden. Dies kann erreicht werden indem entweder ein Trip6- oder nTrip6-Transgen in den Vorkern befruchteter Eizellen von konditionell *trip6*-defizienten Mäusen injiziert wird. Hieraus können Mäuse generiert werden, die entweder nur Trip6 oder nur nTrip6 exprimieren. Diese Mäuse werden es in Zukunft möglich machen, die Funktionen von Trip6 und nTrip6 differenziert *in vivo* zu untersuchen.

## 5. Referenzen

**Angel P**, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*. 1987 Jun 19;49(6):729-39.

**Angel P**, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57.

**Bach I**. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*. 2000 Mar 1;91(1-2):5-17.

**Beato M**. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989 Feb 10;56(3):335-44.

**Beato M**, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):851-7.

**Beg AA**, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*. 1995 Jul 13;376(6536):167-70.

**Behringer R** und Magnuson T (Editors). Conditional alleles in mice (Special Issue). In: *Genesis*. Wiley-Liss, 2002, vol. 32, issue 2.

**Beretta L**, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*. 1996 Feb 1;15(3):658-64.

**Black DL**. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:291-336.

**Boguski MS**, Tolstoshev CM, Bassett DE Jr. Gene discovery in dbEST. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):1993-4.

**Brett D**, Hanke J, Lehmann G, Haase S, Delbruck S, Krueger S, Reich J, Bork P. EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms. *FEBS Lett*. 2000 May 26;474(1):83-6.

**Brostjan C**, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kappaB and not ATF/c-Jun. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3836-44.

**Brown** EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994 Jun 30;369(6483):756-8.

**Buchholz** F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*. 1996 Nov 1;24(21):4256-62.

**Calkhoven** CF, Muller C, Leutz A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev*. 2000 Aug 1;14(15):1920-32.

**Calkhoven** CF, Muller C, Leutz A. Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med*. 2002 Dec;8(12):577-83.

**Cuppen** E, van Ham M, Wansink DG, de Leeuw A, Wieringa B, Hendriks W. The zyxin-related protein TRIP6 interacts with PDZ motifs in the adaptor protein RIL and the protein tyrosine phosphatase PTP-BL. *Eur J Cell Biol*. 2000 Apr;79(4):283-93.

**Dawid** IB, Breen JJ, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*. 1998 Apr;14(4):156-62.

**De Benedetti** A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3189-99.

**Deng** C, Capecchi MR. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol*. 1992 Aug;12(8):3365-71.

**Dever** TE. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 2002 Feb 22;108(4):545-56.

**Dreyfuss** G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):195-205.

**Dua** K, Williams TM, Beretta L. Translational control of the proteome: relevance to cancer. *Proteomics*. 2001 Oct;1(10):1191-9.

**Fasken** MB, Corbett AH. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(6):482-8.

**Feuerstein R**, Wang X, Song D, Cooke NE, Liebhaber SA. The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10655-9.

**Fiering S**, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DI, Enver T, Ley TJ, Groudine M. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev*. 1995 Sep 15;9(18):2203-13.

**Freyd G**, Kim SK, Horvitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*. 1990 Apr 26;344(6269):876-9.

**Gebauer F**, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):827-35.

**Ghilardi N**, Wiestner A, Skoda RC. Thrombopoietin production is inhibited by a translational mechanism. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4023-30.

**Ghosh S**, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.

**Giguere V**. Structure and function of the nuclear receptor superfamily for steroid, thyroid hormone and retinoic acid. *Genet Eng (N Y)*. 1990;12:183-200.

**Gingras AC**, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:913-63.

**Gingras AC**, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*. 2001 Nov 1;15(21):2852-64. (a)

**Gingras AC**, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001 Apr 1;15(7):807-26. (b)

**Greten FR**, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*. 2004 Apr 8;206(2):193-9.

**Gluzman Y**. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981 Jan;23(1):175-82.



**Gur'ianova** OA, Sablina AA, Chumakov PM, Frolova EI. Down-regulation of TRIP6 expression induces actin cytoskeleton rearrangements in human carcinoma cell lines. *Mol Biol (Mosk)*. 2005 Sep-Oct;39(5):905-9.

**Hanks** SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays*. 1997 Feb;19(2):137-45.

**Harding** HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1099-108.

**Harigai** M, Miyashita T, Hanada M, Reed JC. A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene*. 1996 Mar 21;12(6):1369-74.

**Heck** S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J*. 1994 Sep 1;13(17):4087-95.

**Heilbock**, C. Das LIM-Domänen Protein Trip6 ist essentiell für den Crosstalk der Transkriptionsfaktoren GR, AP-1 und NF- $\kappa$ B. Wissenschaftliche Berichte FZKA 7108, Mai 2005

**Hellen** CU, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1593-612.

**Hengst** L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996 Mar 29;271(5257):1861-4.

**Herrlich** P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2465-75.

**Hilberg** F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*. 1993 Sep 9;365(6442):179-81.

**Hotchin** NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol*. 1995 Dec;131(6 Pt 2):1857-65.

**Jochum** W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2401-12.

**Jonat C**, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*. 1990 Sep 21;62(6):1189-204.

**Jurata LW**, Gill GN. Structure and function of LIM domains. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;228:75-113.

**Jurica MS**, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*. 2003 Jul;12(1):5-14.

**Kadrmas JL**, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):920-31.

**Kan Z**, Rouchka EC, Gish WR, States DJ. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res*. 2001 May;11(5):889-900.

**Karlsson O**, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*. 1990 Apr 26;344(6269):879-82.

**Kassel O**, Schneider S, Heilbock C, Litfin M, Gottlicher M, Herrlich P. A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters. *Genes Dev*. 2004 Oct 15;18(20):2518-28.

**Kozak M**. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. 1978 Dec;15(4):1109-23.

**Kozak M**. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 1981 Oct 24;9(20):5233-52.

**Kozak M**. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature*. 1984 Mar 15-21;308(5956):241-6.

**Kozak M**. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 1986 Jan 31;44(2):283-92.

**Kozak M**. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1987 Oct 26;15(20):8125-48.

**Kozak M**. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*. 1989 Feb;108(2):229-41.

**Kozak M.** An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol.* 1991 Nov;115(4):887-903.

**Kozak M.** Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):187-208.

**Kozak M.** Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 2002 Oct 16;299(1-2):1-34.

**König H, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P.** Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* 1992 Jun;11(6):2241-6.

**Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M.** Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res.* 1998 Aug 1;242(2):540-7.

**Lai YJ, Chen CS, Lin WC, Lin FT.** c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul;25(14):5859-68.

**Lawrence JC Jr, Abraham RT.** PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci.* 1997 Sep;22(9):345-9.

**Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N.** Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature.* 1990 Jun 7;345(6275):544-7.

**Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD.** Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 1995 Feb;9(2):243-54.

**Lee W, Mitchell P, Tjian R.** Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell.* 1987 Jun 19;49(6):741-52.

**Lewandoski M.** Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet.* 2001 Oct;2(10):743-55.

**Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):835-9.

**Maquat** LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Feb;5(2):89-99.

**McKay** LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 1999 Aug;20(4):435-59.

**Michiels** F, Habets GG, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature.* 1995 May 25;375(6529):338-40.

**Mills** GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Aug;3(8):582-91.

**Mironov** AA, Fickett JW, Gelfand MS. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res.* 1999 Dec;9(12):1288-93.

**Modrek** B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jul 1;29(13):2850-9.

**Morris** DR. Growth control of translation in mammalian cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1995;51:339-63.

**Murthy** KK, Clark K, Fortin Y, Shen SH, Banville D. ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E. *J Biol Chem.* 1999 Jul 16;274(29):20679-87.

**Nilsen** TW. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays.* 2003 Dec;25(12):1147-9.

**Nishizuka** Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984 Apr 19-25;308(5961):693-8.

**Nissen** RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 2000 Sep 15;14(18):2314-29.

**Nordeen** SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques.* 1988 May;6(5):454-8.

**Ossipow V**, Descombes P, Schibler U. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8219-23.

**Pawson T**, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):445-52.

**Perez-Alvarado GC**, Miles C, Michelsen JW, Louis HA, Winge DR, Beckerle MC, Summers MF. Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat Struct Biol*. 1994 Jun;1(6):388-98.

**Pestova TV**, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7029-36.

**Pratt WB**, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997 Jun;18(3):306-60.

**Reichardt HM**, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 1998 May 15;93(4):531-41.

**Rhoads RE**, Joshi B, Minich WB. Participation of initiation factors in the recruitment of mRNA to ribosomes. *Biochimie*. 1994;76(9):831-8.

**Ridley AJ**, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992 Aug 7;70(3):401-10.

**Ridley AJ**, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.

**Rogatsky I**, Zarembek KA, Yamamoto KR. Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J*. 2001 Nov 1;20(21):6071-83.

**Rosenwald IB**. Upregulated expression of the genes encoding translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha in transformed cells. *Cancer Lett*. 1996 Apr 19;102(1-2):113-23.

**Rousseau D**, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene*. 1996 Dec 5;13(11):2415-20. (a)

**Rousseau D**, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Feb 6;93(3):1065-70. (b)

**Sanz-Rodriguez F**, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32858-68. Epub 2004 May 17.

**Sauer B**. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. 1998 Apr;14(4):381-92.

**Schmeichel KL**, Beckerle MC. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):211-9.

**Schneider S**. Identifizierung von zusätzlichen Proteinen die an der Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 durch den Glukokortikoidrezeptor beteiligt sind. Wissenschaftliche Berichte FZKA 6587, Juli 2001

**Schneikert J**, Peterziel H, Defossez PA, Klocker H, Launoit Y, Cato AC. Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):23907-13.

**Schorpp-Kistner M**, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J*. 1999 Feb 15;18(4):934-48.

**Schreiber M**, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF. Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development*. 2000 Nov;127(22):4937-48.

**Schüle R**, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*. 1990 Sep 21;62(6):1217-26.

**Sen R**, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):921-8.

**Seufferlein T**, Rozengurt E. Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1994 Mar 25;269(12):9345-51.

**Sharp PA**. Split genes and RNA splicing. *Cell*. 1994 Jun 17;77(6):805-15.

**Sharp** PA, Zamore PD. Molecular biology. RNA interference. Science. 2000 Mar 31;287(5462):2431-3.

**Shin** BS, Maag D, Roll-Mecak A, Arefin MS, Burley SK, Lorsch JR, Dever TE. Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. Cell. 2002 Dec 27;111(7):1015-25.

**Smith** CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. Trends Biochem Sci. 2000 Aug;25(8):381-8.

**Smith** E, Meyerrose TE, Kohler T, Namdar-Attar M, Bab N, Lahat O, Noh T, Li J, Karaman MW, Hacia JG, Chen TT, Nolta JA, Muller R, Bab I, Frenkel B. Leaky ribosomal scanning in mammalian genomes: significance of histone H4 alternative translation in vivo. Nucleic Acids Res. 2005 Mar 1;33(4):1298-308.

**Stamm** S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. Function of alternative splicing. Gene. 2005 Jan 3;344:1-20.

**Sternberg** N, Hamilton D, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. J Mol Biol. 1981 Aug 25;150(4):487-507.

**Stunnenberg** HG. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. Bioessays. 1993 May;15(5):309-15.

**Summerton** J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997 Jun;7(3):187-95.

**Summerton** J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 10;1489(1):141-58.

**Takaishi** K, Kikuchi A, Kuroda S, Kotani K, Sasaki T, Takai Y. Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. Mol Cell Biol. 1993 Jan;13(1):72-9.

**Takizawa** N, Smith TC, Nebl T, Crowley JL, Palmieri SJ, Lifshitz LM, Ehrhardt AG, Hoffman LM, Beckerle MC, Luna EJ. Supervillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1. J Cell Biol. 2006 Jul 31;174(3):447-58.

**Thomas** KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell. 1987 Nov 6;51(3):503-12.

**Thomas** KR, Deng C, Capecchi MR. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol.* 1992 Jul;12(7):2919-23.

**Torres** RM, Kühn R. *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting.* Oxford University Press, 1997

**Touriol** C, Bornes S, Bonnal S, Audigier S, Prats H, Prats AC, Vagner S. Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell.* 2003 May-Jun;95(3-4):169-78.

**Wagner** EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev.* 2005 Dec;208:126-40.

**Wang** Y, Dooher JE, Koedood Zhao M, Gilmore TD. Characterization of mouse Trip6: a putative intracellular signaling protein. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):403-9.

**Wang** Y, Gilmore TD. LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 23;1538(2-3):260-72.

**Way** JC, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell.* 1988 Jul 1;54(1):5-16.

**Wickens** M, Goodwin E, Kimble J, Strickland S, Hentze M. in *Translational control of gene expression* (eds Sonenberg N, Hershey JW, Mathews BMB) 295 (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2000)

**Wolffe** AP, Meric F. Coupling transcription to translation: a novel site for the regulation of eukaryotic gene expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Mar;28(3):247-57.

**Worley** MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F. *Salmonella typhimurium* disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 21;103(47):17915-20. Epub 2006 Nov 9.

**Xu** J, Lai YJ, Lin WC, Lin FT. TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):10459-68.

**Yamamoto** KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet.* 1985;19:209-52.



**Yi J, Beckerle MC.** The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics*. 1998 Apr 15;49(2):314-6.

**Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M.** Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 1990 Sep 21;62(6):1205-15.

**Yi J, Kloeker S, Jensen CC, Bockholt S, Honda H, Hirai H, Beckerle MC.** Members of the Zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130Cas family of signal transducers. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):9580-9.

**Zhao MK, Wang Y, Murphy K, Yi J, Beckerle MC, Gilmore TD.** LIM domain-containing protein trip6 can act as a coactivator for the v-Rel transcription factor. *Gene Expr*. 1999;8(4):207-17.

## 6. Abkürzungen

<b>A</b>	Adenin
<b>A</b>	Ampere
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Acc. Nr.</b>	<i>accession number</i>
<b>AP-1</b>	Aktivator Protein 1
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>BP</b>	Bindeprotein
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>C</b>	Cytosin
<b>cDNA</b>	<i>complementary</i> DNA
<b>D</b>	Asparaginsäure
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dTNP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetracetat
<b>eIF</b>	eukaryotischer Initiationsfaktor
<b>EST</b>	<i>expressed sequence tag</i>
<b>ES-Zellen</b>	embryonale Stammzellen
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>Flox</b>	gefloxt (von zwei loxP-Sequenzen flankierte Sequenz)
<b>for</b>	<i>forward</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>GR</b>	Glukokortikoidrezeptor
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	hour
<b>IRES</b>	<i>internal ribosomal entry site</i> (interne ribosomale Eintrittsstellen)
<b>HA</b>	Hämagglutinin Epitop aus <i>Hämophilus influenza</i>
<b>HR</b>	homologe Rekombination
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>K</b>	Kontrolle
<b>k</b>	Kilo
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LRS</b>	<b>leaky ribosomal scanning</b>
<b>loxP</b>	Lokus of <i>crossover</i> (x) in P1
<b>LPA</b>	Lysophatsäure
<b>Luc</b>	Luciferase

<b>m</b>	Milli
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<b>min</b>	Minute
<b>MOPS</b>	4-Morpholinpropansulfonsäure
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MT6</b>	murines Trip6
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>μ</b>	Micro
<b>n</b>	Nano
<b>neo</b>	Neomycin (G418)
<b>NES</b>	Nukleäres Export Signal
<b>NF</b>	Nukleärer Faktor
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>Nr</b>	Nummer
<b>Nt</b>	Nukleotid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PIC</b>	Protease Inhibitor Cocktail
<b>PMSF</b>	Phenylmethansulfonylfluorid
<b>rev</b>	<i>reverse</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>RT</b>	Reverse Transkription
<b>RXR</b>	Retinsäurerezeptor
<b>S</b>	Svedberg-Einheit
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Sodium-Dodecyl-Sulfate
<b>siRNA</b>	<i>small interfering ribonucleic acid</i> (kleine interferierende Ribonukleinsäuren)
<b>T</b>	Thymin
<b>TAE</b>	Tri/Acetat/EDTA Elektrophoresepuffer
<b>TBE</b>	Tris/Borsäure/EDTA Elektrophoresepuffer
<b>TE</b>	Tris/EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
<b>tk</b>	Thymidinkinase
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
<b>TR</b>	Thyroidhormonrezeptor
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TRITC</b>	Tetramethyl-Rhodamin Iso-Thiocyanat
<b>tRNA</b>	Transfer-Ribonukleinsäure
<b>U</b>	Unit
<b>UTR</b>	untranslatierte Region
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>V5</b>	V-Protein-Epitop des Paramyxovirus
<b>WT</b>	Wildtyp